



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

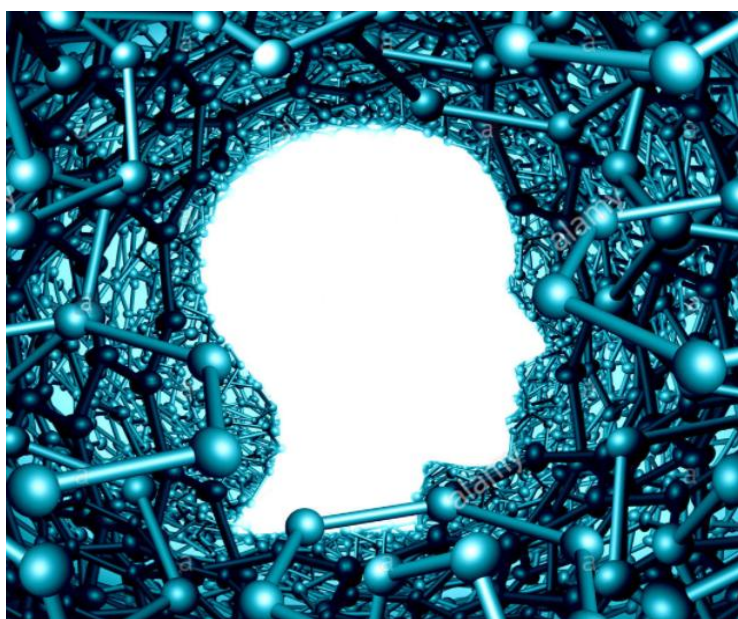
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Π.Μ.Σ. : ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Διπλωματική εργασία

Εκτίμηση κινδύνου των νανοϋλικών



ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΛΕΜΟΝΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ, 2021

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Κουρέτας

Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων Καθηγητής)

Αριστείδης Βεσκούκης

Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, Σχολή Επιστημών Φυσικής Αγωγής, Αθλητισμού και Διαιτολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Χαριτίνη Νέπκα

Ιατρός – Κυτταροπαθολόγος, Τμήμα Παθολογίας, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Δημήτριο Κουρέτα για την ανάθεση του θέματος, το ενδιαφέρον, καθώς και για όλες τις χρήσιμες συμβουλές και την καθοδήγησή του σχετικά με τη διεκπεραίωση της παρούσας βιβλιογραφικής εργασίας.

Ακόμη, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον υποψήφιο διδάκτορα Βαρδάκα Περικλή για την υπομονή, την πολύτιμη βοήθεια, καθώς και για το χρόνο που διέθεσε, αλλά και για τις συμβουλές του σχετικά με τη συγγραφή και διόρθωση της συγκεκριμένης εργασίας. Μου έδωσε χρήσιμες κατευθύνσεις ως προς την αναζήτηση της βιβλιογραφίας και με βοήθησε να βελτιώσω τον τρόπο σκέψης μου.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Αριστείδη Βεσκούκη και την κα. Χαριτίνη Νέπκα για τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Τέλος, ευχαριστώ μέσα από τα βάθη της καρδιάς μου την οικογένειά μου για την αμέριστη υποστήριξη, που δείχνει σε κάθε μου επιλογή.

Περιεχόμενα

Περίληψη	6
Abstract	7
1. Εισαγωγή	8
1.1 Νανοτεχνολογία	8
1.2 Νανοϋλικά.....	11
1.3 Κατηγοριοποίηση νανοϋλικών	12
1.4 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά νανοϋλικών	14
1.4.1 Μέγεθος.....	14
1.4.2 Μορφολογία	15
1.4.3 Φορτίο και επικάλυψη επιφανείας	16
1.4.4 Διαλυτότητα	16
1.4.5 Κρυσταλλική δομή	17
1.5 Χαρακτηρισμός νανοϋλικών.....	17
1.6 Οδοί έκθεσης.....	18
1.6.1 Έκθεση μέσω εισπνοής	18
1.6.2 Έκθεση μέσω κατάποσης.....	19
1.6.3 Έκθεση μέσω του δέρματος.....	20
1.7 Εφαρμογές νανοϋλικών	21
2. Νανοτοξικολογία	22
2.1 Είδη τοξικότητας.....	23
2.1.1 Κυτταροτοξικότητα.....	23
2.1.2 Γενοτοξικότητα	23
2.1.3 Οικοτοξικότητα	24
2.2 Μηχανισμοί τοξικότητας των νανοϋλικών	25
2.3 Δημιουργία ROS	25

2.3.1 Θετικές επιδράσεις των ROS	26
2.3.2 Αρνητικές επιδράσεις των ROS	27
2.4 Οξειδωτικό στρες	27
2.5 Νανοϋλικά & ROS	28
3. In vitro δοκιμές	30
3.1 Επιδράσεις των νανοϋλικών σε in vitro δοκιμές	34
3.1.1 Επιδράσεις στην κυτταρική βιωσιμότητα και θνησιμότητα	34
3.1.2 Επιδράσεις στις κυτταρικές σειρές.....	35
3.1.3 Δόση και LD50	37
3.1.4 Μηχανιστικές μελέτες	38
4. In vivo δοκιμές.....	39
4.1 Μέθοδοι εκτίμησης τοξικότητας in vivo	39
4.2 Επιδράσεις σε συστήματα in vivo.....	40
4.2.1 Μηχανιστικές μελέτες.....	42
5. Συμπεράσματα	43
Βιβλιογραφία	45

Περίληψη

Τις τελευταίες δεκαετίες η νανοτεχνολογία έχει εξελιχθεί σε ένα σημαντικό βιομηχανικό κλάδο, καθώς δεν αποτελεί πλέον ένα απλό επιστημονικό ενδιαφέρον, αλλά μία προηγμένη τεχνική και επιστήμη, με άμεσες εφαρμογές σε πολλά πεδία της καθημερινότητας. Τα νανοϋλικά κάνουν όλο και πιο έντονη την παρουσία τους σε εμπορικά προϊόντα, όπως τρόφιμα, φάρμακα, καλλυντικά, ρούχα, δομικά υλικά και ηλεκτρικές συσκευές. Ως εκ τούτου, κρίνεται απαραίτητη η εκτίμηση κινδύνου των νανοϋλικών προκειμένου να ληφθούν χρήσιμες απαντήσεις σχετικά με τις δυσμενείς τους επιδράσεις τόσο στην ανθρώπινη υγεία, όσο και στο περιβάλλον. Σε αυτό το πλαίσιο, η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην εκτίμηση του κινδύνου των νανοϋλικών μέσω βιβλιογραφικής ανασκόπησης και επικεντρώνεται σε μία από τις κύριες τοξικές επιδράσεις αυτών, και πιο συγκεκριμένα την αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και την επακόλουθη επαγωγή οξειδωτικού στρες. Προς αυτή την κατεύθυνση, γίνεται εκτενής αναφορά στις πιθανές οδούς έκθεσης του ανθρώπου στα νανοϋλικά, ενώ ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά, που επηρεάζουν άμεσα το βαθμό της επαγόμενης τοξικότητας. Ακολούθως, παρατίθενται τα αποτελέσματα *in vitro* δοκιμών, που είναι και οι επικρατέστερες, λόγω του γεγονότος ότι δεν τίθενται θέματα βιοηθικής φύσης, όσο και *in vivo* δοκιμών που έχουν προκύψει από την αξιολόγηση της τοξικότητας μίας μεγάλης ποικιλίας νανοϋλικών. Τέλος, περιγράφονται μελέτες από τη διεθνή βιβλιογραφία, οι οποίες στοχεύουν στην αναζήτηση είτε της πιθανής ευεργετικής, είτε της τοξικής επίδρασης των νανοϋλικών.

Abstract

In recent decades, nanotechnology has turned into an important industrial sector, further representing a whole scientific field with advanced techniques and direct applications in many areas of daily life. Nowadays, nanomaterials are present in a vast number of commercial products, such as foods, medicines, cosmetics, clothes, building materials and electrical appliances. Hence, the risk assessment of nanomaterials is considered a prerequisite in order to obtain useful answers regarding their adverse effects on human health and the environment. In this context, the present study aims to assess the risk of nanomaterials exposure via literature review, and focuses predominantly on one of the main toxic effects resulting from exposure to nanomaterials, and in particular on the increased production of reactive oxygen species (ROS) and the consequent induction of oxidative stress. Toward that end, an extensive report is made concerning the potential routes of human exposure to nanomaterials, while special emphasis is also given to their physicochemical properties which significantly affect their toxicity. Furthermore, in vitro and in vivo assays for assessing the toxicity of nanomaterials are included, whereas in vitro assays are the most prevalent due to the absence of bioethical issues. Finally, we have mentioned previous studies, that have been carried out in search of either beneficial or toxic effects of nanomaterials.

1. Εισαγωγή

1.1 Νανοτεχνολογία

Η νανοτεχνολογία ορίζεται ως η ικανότητα ελέγχου και εκμετάλλευσης της ύλης σε ατομικό και μοριακό επίπεδο, σε εύρος μεγέθους 1-100 nm σε τουλάχιστον μία διάσταση, καθώς και η σύγκριση των διακριτών ιδιοτήτων και φαινομένων που παρατηρούνται στη νανοκλίμακα με εκείνα που αφορούν μεμονωμένα άτομα ή μόρια (Roco, 2011). Ο φυσικός Richard Feynman θεωρείται ο «πατέρας» της νανοτεχνολογίας, καθότι με την ομιλία του «There's Plenty of Room at the Bottom» το 1959 εισήγαγε την ιδέα του χειρισμού της ύλης σε ατομικό επίπεδο (Hulla, Sahu and Hayes, 2015). Εντούτοις, ο συγκεκριμένος όρος εισήχθη για πρώτη φορά από τον καθηγητή Norio Taniguchi το 1974 υποστηρίζοντας ότι «η νανοτεχνολογία αποτελείται κυρίως από την επεξεργασία, το διαχωρισμό, την ενοποίηση και την παραμόρφωση των υλικών από ένα άτομο ή από ένα μόριο» (Mohan Bhagyaraj and Oluwafemi, 2018). Ακολούθως, τη δεκαετία του 1980, η βασική ιδέα αυτού του ορισμού διερευνήθηκε εκτενέστερα από τον καθηγητή Eric Drexler, ο οποίος προώθησε περαιτέρω την τεχνολογική σημασία των φαινομένων και των δομών στη νανοκλίμακα μέσω μίας σειράς ομιλιών και βιβλίων (Tarafdar, Shikha and Ramesh, 2013). Έκτοτε ο τομέας της νανοτεχνολογίας παρουσίασε θεαματική εξέλιξη και τα τελευταία χρόνια αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά και καινοτόμα επιστημονικά πεδία, συχνά διασυνδεδεμένο με τους τομείς της Φυσικής, της Χημείας, της Μηχανικής και της Βιολογίας.

Η νανοτεχνολογία συνδυάζει περισσότερες της μίας τεχνολογίες, ικανές να τροποποιήσουν την ύλη και τις χαρακτηριστικές της ιδιότητες τόσο σε ατομικό, όσο και σε μοριακό επίπεδο (Gökçay and Arda, 2015). Ειδικότερα, περιλαμβάνει την ανάπτυξη ή την τροποποίηση υλικών εντός της νανοκλίμακας, παρέχοντας ένα τελικό υλικό μικρότερο, ελαφρύτερο, ισχυρότερο και ανθεκτικότερο (Kaur *et al.*, 2015). Σχετίζεται με ποικίλες δομές της ύλης, με διαστάσεις της τάξης του δισεκατομμυριοστού του μέτρου (νανόμετρο, nm) και βασίζεται στο γεγονός ότι σωματίδια, με μέγεθος μικρότερο των 100 nm προσδίδουν σε δομές, που απαρτίζονται από αυτά, νέες ιδιότητες και συμπεριφορά. Το γεγονός αυτό οφείλεται στις μοναδικές φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων, οι οποίες πηγάζουν από το χαρακτηριστικό τους μέγεθος (Poole and Owens, 2003).

Σήμερα, η νανοτεχνολογία βρίσκει πληθώρα εφαρμογών σε πολλαπλούς κλάδους, που έχουν αντίκτυπο στην καθημερινή ζωή του ανθρώπου (Divya and Muthuvinothini, 2015). Καθώς η νανοτεχνολογία αποτελεί μια προηγμένη τεχνική και επιστήμη, που εισήλθε σταδιακά στην ανθρώπινη καθημερινότητα, η χρήση της έχει επεκταθεί σε εμπορικά προϊόντα, όπως τρόφιμα, φάρμακα, βαφές και δομικά υλικά. Μάλιστα, με τις ολοένα και αυξανόμενες εφαρμογές της δίνεται στο άμεσο μέλλον η δυνατότητα δημιουργίας νέων αποτελεσματικότερων φάρμακων για την πρόληψη και την αντιμετώπιση πληθώρας ασθενειών, κατασκευής καινοτόμων υλικών, καθώς και νέων συσκευών (Chaurasia, 2017). Πιο αναλυτικά, οι κυριότερες εφαρμογές της νανοτεχνολογίας στην καθημερινή ζωή περιλαμβάνουν, αλλά δεν περιορίζονται, στις ακόλουθες κατηγορίες:

1) Ιατρική - Φαρμακευτικά προϊόντα

Η ενσωμάτωση της νανοτεχνολογίας στον κλάδο της ιατρικής και των φαρμακευτικών προϊόντων έχει ιδιαίτερη βαρύτητα στον 21^ο αιώνα. Σε αυτό το πλαίσιο, αναδύθηκε η επιστήμη της νανοϊατρικής, μία εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στον τομέα της υγείας και της ιατρικής, η οποία χρησιμοποιεί νανοϋλικά και νανο-ηλεκτρονικούς βιοαισθητήρες (Nikalje, 2015). Ειδικότερα, περιλαμβάνει τη χρήση νανოსωματιδίων, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων ή άλλων ουσιών, θερμότητας και φωτός σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συγκεκριμένη τεχνική αξιοποιείται όχι μόνο για την επιδιόρθωση των βλαβών στα κύτταρα, αλλά και για την ταχύτερη ανίχνευση της εξεταζόμενης ασθένειας.

Μία από τις κυριότερες εφαρμογές της νανοϊατρικής είναι η στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων ή άλλων μορίων σε συγκεκριμένα όργανα και ιστούς μέσω της χρήσης της νανοτεχνολογίας. Τα νανοςυστήματα, εξαιτίας των ιδιαίτερων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους ενισχύουν την απόδοση των φαρμάκων, καθώς βελτιώνουν τη διαλυτότητα και τη βιοδιαθεσιμότητά τους, καθιστώντας τα πιο αποτελεσματικά (Reza Mozafari, 2007). Προς αυτή την κατεύθυνση, ένας άμεσος στόχος της νανοτεχνολογίας είναι η χρήση νανοςωματιδίων για την ενσωμάτωση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, τα οποία θα δρουν απευθείας στα καρκινικά κύτταρα (Chaurasia, 2017). Παράλληλα, η επιφανειακή τροποποίηση με τμήματα

στόχευσης του καρκίνου μπορεί να συνεισφέρει στην κατασκευή θεραπευτικών νανοσυστημάτων, τα οποία θα επιτρέπουν την ταυτόχρονη διάγνωση και θεραπεία.

2) Εμπορικά προϊόντα

Η χρήση των νανοϋλικών έχει αυξηθεί ραγδαία τα τελευταία χρόνια, ενώ εσχάτως τα νανοϋλικά έχουν ενσωματωθεί σε εμπορικά προϊόντα εξαιτίας των μοναδικών τους ιδιοτήτων και των επακόλουθων πλεονεκτημάτων που προσφέρουν. Τα βακτήρια και ο πολλαπλασιασμός τους αποτελούν μία ολοένα και αυξανόμενη ανησυχία στην καθημερινή ζωή, καθώς επηρεάζουν το νερό, τα τρόφιμα, τα υφάσματα κ.α. Υπό αυτό το πρίσμα, νανοσωματίδια με αντιμικροβιακή δράση χρησιμοποιούνται σε υφάσματα, για τη θανάτωση βακτηρίων και τον περιορισμό του βακτηριακού αποικισμού (Chaurasia, 2017; Díez-Pascual, 2018). Επίσης, προϊόντα περιποίησης του δέρματος περιέχουν νανοσωματίδια, για να μεταφέρουν βιταμίνες, που εισχωρούν στο δέρμα. Ορισμένα προϊόντα διατροφής, όπως για παράδειγμα φυτικά έλαια, περιέχουν νανοσωλήνες με συστατικά όπως βιταμίνες (Chaurasia, 2017). Παράλληλα, τα νανοϋλικά βρίσκουν εφαρμογή στη συσκευασία και τη συντήρηση τροφίμων, αλλά και ως ενισχυτικά γεύσης (Kumar, 2015). Τονίζεται ότι οι μελλοντικές εφαρμογές τους στα τρόφιμα μπορούν να επεκταθούν στη βελτίωση της διάρκειας ζωής και της ποιότητας των τροφίμων, αλλά ακόμη και στην κατασκευή βιοαισθητήρων, που πρόκειται να αναγνωρίζουν τα μολυσμένα ή χαλασμένα τρόφιμα (Ranjan *et al.*, 2014).

3) Ηλεκτρονικά συστήματα

Στην ηλεκτρονική βιομηχανία, υπάρχει η ανάγκη για χρήση νέων νανοϋλικών με αυξημένη διηλεκτρική σταθερά, προκειμένου να κατασκευαστούν λεπτές και μικροσκοπικές ηλεκτρονικές συσκευές (De and Madhuri, 2020). Η χρήση νανοσωματιδίων βελτιώνει τις τεχνικές δυνατότητες των ηλεκτρονικών συσκευών μέσω της μείωσης του βάρους και της κατανάλωσής τους, της ανάπτυξης εξελιγμένων οθονών και καρτών μνήμης με αυξημένη χωρητικότητα (Chaurasia, 2017). Τα νανοϋλικά μετάλλων και οι νανοσωλήνες άνθρακα είναι αρκετά ελπιδοφόρα ως προς την εφαρμογή τους στα ηλεκτρονικά συστήματα, εξαιτίας των μοναδικών τους ιδιοτήτων, όπως η υψηλή αγωγιμότητα, η μηχανική ευελιξία και η παραγωγή συσκευών χαμηλού κόστους (Kamyshny and Magdassi, 2014).

4) Περιβάλλον

Η χρήση της νανοτεχνολογίας έχει επεκταθεί στην αντιμετώπιση της μόλυνσης του περιβάλλοντος. Αρκετές μελέτες υποδεικνύουν ότι η συνδυαστική χρήση των νανοσωματιδίων και της συμβατικής επεξεργασίας θα μπορούσε να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της απομάκρυνσης ρύπων, όπως τα οργανικά υλικά (Mobasser and Akbar Firoozi, 2016). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι νανοϋλικά χρησιμοποιούνται ως καταλύτες για τη μείωση των ρύπων, ενώ το πετρέλαιο ως καύσιμο μπορεί να εμπλουτιστεί με νανοσωματίδια οξειδίου του δημητρίου (CeO_2) ώστε να μειώνονται οι εκπομπές του. Παράλληλα, οι νανοσωλήνες άνθρακα χρησιμοποιούνται σε ανεμογεννήτριες, προκειμένου να αυξηθεί η αντοχή των ελίκων και να μειωθεί το βάρος τους, αυξάνοντας ταυτόχρονα την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας. Τέλος, το οξείδιο του προπυλενίου χρησιμοποιείται για την κατασκευή πλαστικών και βαφών (Chaurasia, 2017).

1.2 Νανοϋλικά

Τα νανοϋλικά αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο της επιστήμης της νανοτεχνολογίας. Σύμφωνα με τον ορισμό που έχει υιοθετηθεί από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή ως νανοϋλικό ορίζεται «ένα φυσικό, περιστασιακό ή μεταποιημένο υλικό που περιέχει σωματίδια, σε μη δεσμευμένη μορφή ως σύμπηγμα ή συσσωμάτωμα και εφόσον, σύμφωνα με την κατανομή των αριθμητικών μεγεθών, τουλάχιστον το 50% των σωματιδίων έχει μία ή περισσότερες εξωτερικές διαστάσεις εντός της κλίμακας μεγέθους 1 – 100 nm». Η ικανότητα επιλεκτικής ρύθμισης των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των νανοϋλικών, όπως το σημείο τήξης, η αγωγιμότητα, η απορρόφηση και η σκέδαση του φωτός, καθώς και η καταλυτική δραστηριότητα, τους έχει προσδώσει εξέχουσα θέση στις τρέχουσες τεχνολογικές εξελίξεις, αλλά και σημαντικό πλεονέκτημα έναντι των ομόλογων υλικών που ανήκουν σε μεγαλύτερη κλίμακα μεγέθους (Jeevanandam *et al.*, 2018).

Τα νανοϋλικά χρησιμοποιούνται εκτενώς τις τελευταίες δεκαετίες οδηγώντας σταδιακά στην ανάγκη αξιολόγησης τόσο των ποσοστών έκθεσης, όσο και των επιδράσεων αυτών. Παρότι οι σχετικές με τα νανοϋλικά επιστημονικές δημοσιεύσεις έχουν αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, επικεντρώνονται κυρίως στην κατασκευή και την ανάπτυξη νέων νανοϋλικών και σε μικρότερο βαθμό στις βιολογικές επιδράσεις τους. Ως εκ τούτου, η κατανόηση των μοναδικών

τοξικολογικών ιδιοτήτων τους, αλλά και των μακροπρόθεσμων επιπτώσεων στην ανθρώπινη υγεία κρίνεται επί του παρόντος ανεπαρκής (Vardakas *et al.*, 2021).

1.3 Κατηγοριοποίηση νανοϋλικών

Όπως γίνεται αντιληπτό από τον παραπάνω ορισμό, τα νανοϋλικά αποτελούν μία αρκετά ετερογενή ομάδα, όπου τα υλικά διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την προέλευση, το μέγεθος, τη μορφολογία, τις διαστάσεις, τα χαρακτηριστικά επιφάνειας και τη χημική φύση. Συνεπώς, η ταξινόμησή τους μπορεί να βασιστεί σε αρκετά κριτήρια, ωστόσο σε γενικές γραμμές διακρίνονται σε επιμέρους κατηγορίες με βάση την προέλευση, τις διαστάσεις και τη χημική τους φύση (Sudha *et al.*, 2018).

Σε ότι αφορά την πρώτη κατηγορία ταξινόμησης, τα νανοϋλικά μπορούν να διακριθούν σε φυσικά και τεχνητά. Τα φυσικά νανοϋλικά σχηματίζονται στο περιβάλλον χωρίς τη μεσολάβηση ανθρώπινης παρέμβασης και παράγονται από φυσικές διεργασίες, όπως είναι οι φωτοχημικές αντιδράσεις, η διάβρωση, οι ηφαιστειακές εκρήξεις και οι πυρκαγιές (Buzea, Pacheco and Robbie, 2007). Σε αυτά περιλαμβάνεται μια σειρά λεπτών σωματιδίων από ανόργανη τέφρα, αιθάλη και θείο, που εντοπίζονται στον αέρα, αλλά και νανοσωματίδια θείου και σεληνίου, που παράγονται από βακτήρια και ζύμες. Μελλοντικές προσεγγίσεις κάνουν λόγο για αξιοποίηση των φυσικών νανοϋλικών στην αποτελεσματική απομάκρυνση μολυσματικών ουσιών, στη μετατροπή ουσιών και υλικών σε βιολογικά διαθέσιμες μορφές για πρακτικές χρήσεις, αλλά και στην παραγωγή νέων ουσιών από απόβλητα (Griffin *et al.*, 2018). Από την άλλη, τα τεχνητά νανοϋλικά συντίθενται ανθρωπογενώς από μια μεγάλη ποικιλία υλικών, κάνοντας εντονότερη την εμφάνισή τους τις τελευταίες δεκαετίες. Σε ότι αφορά το σχήμα και το μέγεθός τους, περιέχουν σωματίδια ομοιόμορφου μεγέθους, καθώς και μία σειρά από επιφανειακά συνθετικά μόρια, που τα καθιστούν διακριτά σε σχέση με τα φυσικά νανοϋλικά. Παρά την ταχύτατη ανάπτυξη πληθώρας τεχνητών νανοϋλικών, ελάχιστα εξ αυτών χρησιμοποιούνται και ενσωματώνονται σε μεγάλο αριθμό προϊόντων. Μεταξύ των πιο διαδεδομένων συγκαταλέγονται τα νανοϋλικά αργύρου, διοξειδίου του τιτανίου, οξειδίου του ψευδαργύρου, διοξειδίου του πυριτίου, οι νανοσωλήνες άνθρακα και τα φουλλερένια (Maurer-Jones *et al.*, 2013).

Η διαστατικότητα (dimensionality) αποτελεί έναν από τους πιο κοινούς τρόπους διάκρισης, σύμφωνα με την οποία τα νανοϋλικά διακρίνονται σε μηδενικών

διαστάσεων (0D), μονοδιάστατα (1D), δισδιάστατα (2D) και τρισδιάστατα (3D). Ειδικότερα, τα νανοϋλικά μηδενικών διαστάσεων (0D) αναφέρονται σε δομές όπου όλες οι εξωτερικές διαστάσεις τους βρίσκονται εντός της νανοκλίμακας, δηλαδή σε κλίμακα μεγέθους μικρότερη των 100 nm. Στη συγκεκριμένη κατηγορία εντάσσονται οι νανο-σφαίρες, οι νανο-ράβδοι, τα νανοϋλικά τύπου πυρήνα-κελύφους, καθώς και οι κβαντικές τελείες (quantum dots). Ακολούθως, διακρίνονται τα μονοδιάστατα νανοϋλικά (1D), όπου δύο εξωτερικές διαστάσεις της επικείμενης νανοδομής βρίσκονται εντός του εύρους της νανοκλίμακας, ενώ μία εξωτερική διάσταση βρίσκεται εκτός αυτής. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται οι νανοσωλήνες, τα νανοςύρματα, οι νανοϊνες κ.α. Επιπροσθέτως, αναφέρονται τα δισδιάστατα νανοϋλικά (2D), όπου μία εξωτερική διάσταση του υλικού βρίσκεται εντός της νανοκλίμακας και δύο εξωτερικές διαστάσεις βρίσκονται εκτός αυτής. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τα λεπτά υμένια (thin films) και τις νανοπλάκες (Saleh, 2020). Τέλος, τα τρισδιάστατα νανοϋλικά (3D) δεν διαθέτουν καμία εξωτερική διάσταση στη νανοκλίμακα, ωστόσο επιδεικνύουν εσωτερικά χαρακτηριστικά αυτής. Η συγκεκριμένη κατηγορία περιλαμβάνει τα νανοςύνθετα και νανοδομημένα υλικά (Dolez, 2015).

Τέλος, με βάση τη χημική τους φύση, τα νανοϋλικά μπορούν να διακριθούν σε δύο κύριες κατηγορίες και ειδικότερα τα οργανικά και ανόργανα νανοϋλικά. Τα οργανικά νανოსωματίδια αναφέρονται σε στερεά σωματίδια αποτελούμενα από οργανικές ενώσεις με διάμετρο από 10 nm - 1 μm. Έχουν λάβει σχετικά μικρή προσοχή σε σύγκριση με τα ανόργανα υλικά, για τα οποία έχει πραγματοποιηθεί πληθώρα μελετών. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα, όπως οι νανοςωλήνες άνθρακα και τα φουλλερένια, τα λιποσώματα, τα δενδριμερή και τα πολυμερή νανουλικά. Οι νανοςωλήνες άνθρακα είναι σωληνοειδείς δομές με δύο διαστάσεις στην νανοκλίμακα. Βρίσκουν εφαρμογή ως αποτελεσματικοί φορείς για βιοδραστικές ενώσεις και στη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου, αν και απαιτούνται ορισμένες δομικές τροποποιήσεις, ώστε να μην επάγουν κυτταροτοξικότητα (Kumar and Lal, 2014). Τα λιποσώματα αναφέρονται σε σφαιρικές δομές αποτελούμενες από ένα ή περισσότερα λιπίδια ή/και διπλοστιβάδες φωσφολιπιδίων (Puri *et al.*, 2009). Βρίσκουν εφαρμογή στην επεξεργασία τροφίμων, σε φαρμακευτικά προϊόντα, ενώ επίσης χρησιμοποιούνται ως αντιμικροβιακοί παράγοντες και πρόσθετα τροφίμων (Laridi *et al.*, 2003). Ακόμη, τα δενδριμερή είναι

πολυδιακλαδισμένα μόρια, που συνδυάζουν τις ιδιότητες των πολυμερών, καθώς και άλλων μικρών μορίων. Η διάμετρος τους δεν ξεπερνά τα 4 nm, με επικρατέστερες τιμές το 1-2 nm (Duncan and Izzo, 2005). Οι κύριες εφαρμογές τους εντοπίζονται στην ιατρική και την φαρμακευτική, με την απεικόνιση του μαγνητικού συντονισμού (MRI) και τη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων για τη θεραπεία του καρκίνου, αντίστοιχα.

Από την άλλη, τα ανόργανα νανοσωματίδια περιλαμβάνουν τα νανοσωματίδια μετάλλων, οξειδίων των μετάλλων και μεταλλικών αλάτων (Valcárcel and López-Lorente, 2014). Έχουν λάβει σημαντική προσοχή στην προκλινική ανάπτυξη ως πιθανά διαγνωστικά και θεραπευτικά συστήματα στον τομέα της ογκολογίας, συμπεριλαμβανομένης της απεικόνισης όγκων *ex vivo* και *in vivo*, της χορήγησης φαρμάκων ή της ενίσχυσης της ακτινοθεραπείας, επιδεικνύοντας πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα, τα οποία τα καθιστούν ικανά να προχωρήσουν στην κλινική αξιολόγηση (Egusquiaguirre *et al.*, 2012). Υπάρχει μεγάλη ποικιλία ανόργανων νανοσωματιδίων, τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν ως φορείς για την ενδοκυτταρική μεταφορά φαρμάκων, γονιδίων ή πρωτεϊνών. Ωστόσο τα περισσότερα είναι απαραίτητο να υποβάλλονται σε χημική ή βιολογική τροποποίηση, ώστε να πληρούν τις αυστηρές προϋποθέσεις για την κυτταρική μεταφορά, όπως είναι για παράδειγμα η υψηλή βιοσυμβατότητα. Η απαιτούμενη τροποποίηση σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τους τύπους των νανοσωματιδίων που παρέχουν ειδικές λειτουργικές ομάδες στην επιφάνεια (Xu *et al.*, 2006). Σε σύγκριση με τα οργανικά νανοσωματίδια, είναι μη τοξικά, υδρόφιλα, βιοσυμβατά και εξαιρετικά σταθερά (Paul and Sharma, 2010).

1.4 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά νανοϋλικών

1.4.1 Μέγεθος

Το μέγεθος των νανοσωματιδίων είναι ένας από τους κύριους παράγοντες, που επηρεάζουν την τοξικότητα τους (Ganguly, Breen and Pillai, 2018). Η πρόσληψή τους γίνεται εύκολα, επειδή το μέγεθός τους είναι συγκρίσιμο με το μέγεθος των βιολογικών μακρομορίων (Mailänder and Landfester, 2009). Η επιφάνεια των υλικών αυξάνεται με τη μείωση του μεγέθους, παρέχοντας αυξημένη επιφάνεια για αλληλεπίδραση με το κυτταρικό περιβάλλον. Κατά την επαφή των νανοϋλικών με βιολογικά υγρά όπως το αίμα, το πλάσμα ή άλλα ενδοκυτταρικά υγρά, πρωτεΐνες,

λιπίδια και άλλα ενδογενή βιομόρια αλληλεπιδρούν με αυτά, ανταγωνίζομενα για την επιφάνειά τους. Μάλιστα, η αλληλεπίδραση νανοσωματιδίων-πρωτεϊνών οδηγεί στο σχηματισμό ενός συμπλόκου, γνωστό ως πρωτεϊνική κορώνα (protein corona), η οποία μειώνει την ενέργεια της επιφάνειας του νανοϋλικού και του προσδίδει νέες βιολογικές ιδιότητες. Επιπροσθέτως, έχει βρεθεί ότι η πρωτεϊνική κορώνα επηρεάζει την κυκλοφορία του νανοσωματιδίου, την βιοκατανομή του, την πρόσληψη από τα κύτταρα, την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, την τοξικότητα και την επαγωγή του οξειδωτικού στρες. Παράλληλα, τα νανοσωματίδια είναι δυνατόν να τροποποιήσουν την διαμόρφωση και τη βιολογική δραστηριότητα των δεσμευμένων πρωτεϊνών (Zeng *et al.*, 2019). Συνεπώς, το μικρό μέγεθος αποτελεί την κύρια αιτία επαγωγής τοξικότητας. Επιπλέον, το μειωμένο μέγεθος σχετίζεται με την αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), καθότι αυξάνει την επιφάνεια που είναι ικανή να παράγει ROS (Ganguly, Breen and Pillai, 2018).

1.4.2 Μορφολογία

Η μορφολογία των νανοϋλικών αποτελεί κλειδί για την κατανόηση των ιδιοτήτων τους (Henry, 2005) και επηρεάζει σημαντικά τον κυτταρικό μηχανισμό πρόσληψης (Gao, Shi and Freund, 2005). Τα νανοϋλικά έχουν διαφορετικά σχήματα, όπως σφαίρες, σωλήνες, ίνες και άλλα (Ganguly, Breen and Pillai, 2018). Ωστόσο, το σχήμα, το οποίο είναι υπεύθυνο για την επαγωγή τοξικότητας, παίζει ρόλο μόνο κατά την είσοδό του υλικού στο κύτταρο (ενδοκύττωση). Η ενδοκύττωση επηρεάζεται τόσο από το μέγεθος και το σχήμα, όσο και από τη συγκέντρωση του υλικού. Επισημαίνεται ότι το ανώτερο όριο μεγέθους ενός σωματιδίου ικανού για ενδοκύττωση είναι περίπου τα 100 nm (Osaki *et al.*, 2004). Μελέτες που έχουν διεξαχθεί σχετικά με την επίδραση του σχήματος του νανοϋλικού στην επαφή με την κυτταρική μεμβράνη και στην κυτταρική είσοδο συγκεκριμένων νανοϋλικών σε υψηλή αναλογία υποδεικνύουν την πρόκληση διαταραχών στην κυτταρική μεμβράνη και τη δημιουργία πόρων, αντιστοίχως, οι οποίοι διαταράσσουν την ιοντική ισορροπία εντός και εκτός του κυττάρου. Στο τελευταίο, σημαντικό ρόλο παίζει και το γεγονός ότι ορισμένα νανοϋλικά μετά την είσοδό τους στο κύτταρο δημιουργούν συσσωματώματα (Doshi and Mitragotri, 2010; Verma and Stellacci, 2010).

1.4.3 Φορτίο και επικάλυψη επιφανείας

Η τοξικότητα ενός νανοϋλικού προκαλείται λόγω της κυτταρικής αλληλεπίδρασης με την επιφάνειά του (Ganguly, Breen and Pillai, 2018). Οι ιδιότητες της επιφάνειας είναι μεταξύ των βασικών παραγόντων επαγωγής τοξικότητας. Τα νανοϋλικά εισέρχονται εντός του κυττάρου διασχίζοντας την αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Συνεπώς, τα θετικά φορτισμένα ή ουδέτερα νανοϋλικά απορροφώνται ευκολότερα και εισέρχονται στην κυτταρική μεμβράνη, λόγω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης, ενώ τα αρνητικά φορτισμένα σωματίδια δεσμεύονται λιγότερο αποτελεσματικά (Lin *et al.*, 2010). Η επικάλυψη επιφανείας του νανοϋλικού σε πολλές περιπτώσεις σχεδιάζεται με τρόπο κατάλληλο ώστε να στοχεύει ή να αναγνωρίζει συγκεκριμένη σύνδεση σε άλλες επιφάνειες (Singh *et al.*, 2011, 2019). Έχει παρατηρηθεί ότι η επικάλυψη νανοϋλικών, ειδικά με υδρόφιλα πολυμερή, συμβάλλει στην αποφυγή της προσρόφησης πρωτεϊνών στην επιφάνειά τους (Yoo, Doshi and Mitragotri, 2011). Παράλληλα είναι δυνατόν να γίνει και προσθήκη μικρών μορίων, όπως είναι για παράδειγμα τα αντισώματα (Singh *et al.*, 2011, 2019). Γενικά, κατά την επαφή των νανοϋλικών με ένα οποιοδήποτε ετερογενές σύστημα, μικρότερες δομές δύνανται να προσκολληθούν στην επιφάνειά τους με ασθενείς ή ισχυρούς δεσμούς (Elsaesser and Howard, 2012).

1.4.4 Διαλυτότητα

Η διαλυτότητα των νανοϋλικών είναι μια σημαντική παράμετρος για την εκτίμηση του κινδύνου τους. Ωστόσο, δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες για την αξιολόγηση της διαλυτότητάς τους. Λαμβάνοντας υπόψιν το γεγονός ότι ο ανθρώπινος οργανισμός αποτελείται κατά ένα μεγάλο ποσοστό από νερό, η διαλυτότητα στο νερό, καθώς και ο ρυθμός διάλυσης στα βιολογικά υγρά αποτελούν τα πιο σημαντικά κριτήρια ομαδοποίησης των νανοϋλικών με σκοπό την αξιολόγηση του κινδύνου στην ανθρώπινη υγεία (Avramescu *et al.*, 2017). Γενικά, η διαλυτότητα των νανοϋλικών εξαρτάται από τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά. Όσο πιο μικρή διαλυτότητα έχει ένα νανοσωματίδιο, τόσο πιο μεγάλη τοξικότητα παρουσιάζει. Οι υδρόφοβες ομάδες στην επιφάνειά τους είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία συσσωματωμάτων, τα οποία στη συνέχεια απομακρύνονται από το ενδοθηλιακό σύστημα (Peralta-Videa *et al.*, 2011). Υπάρχει πληθώρα νανοϋλικών, που βρίσκει εφαρμογή σε φάρμακα, ωστόσο το γεγονός ότι είναι δυσδιάλυτα δημιουργεί προβλήματα, τα οποία λύνονται

μέσω της επικάλυψης με υδρόφιλα πολυμερή. Με αυτό τον τρόπο, το υδρόφοβο εσωτερικό τους προστατεύεται από το υδατικό περιβάλλον (Torchilin, 2008).

1.4.5 Κρυσταλλική δομή

Προκειμένου να διαπιστωθεί ο ρόλος της κρυσταλλικής δομής των νανοσωματιδίων στην πρόκληση κυτταροτοξικότητας η ερευνητική ομάδα των Hussain *et al.* διεξήγαγε πειράματα με χρήση νανοσωματιδίων διοξειδίου του τιτανίου (TiO_2), υποδεικνύοντας ότι τόσο το μέγεθος όσο και η κρυσταλλική δομή των νανοϋλικών ευθύνονται για την πρόκληση τοξικότητας, ενώ η κρυσταλλική δομή συνδέεται και με το μηχανισμό πρόκλησης του κυτταρικού θανάτου. Ειδικότερα, τα νανοσωματίδια TiO_2 προκαλούν νέκρωση του κυττάρου και επάγουν απόπτωση μέσω του σχηματισμού ROS (Braydich-Stolle *et al.*, 2009).

1.5 Χαρακτηρισμός νανοϋλικών

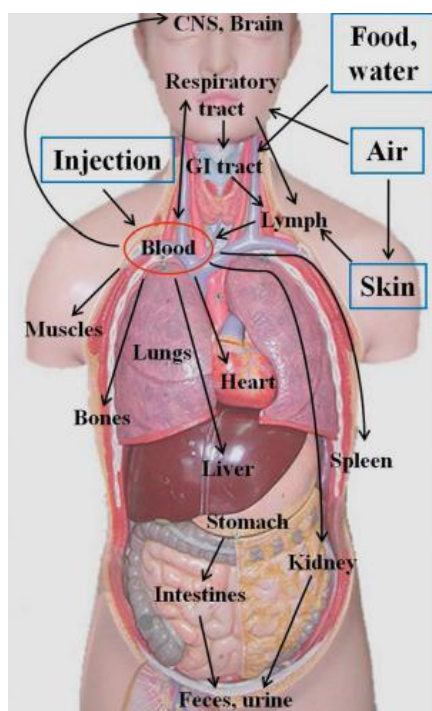
Νέα και τροποποιημένα χαρακτηριστικά καθιστούν τα νανοϋλικά ενδιαφέροντα για την ανάπτυξη νέων προϊόντων και εφαρμογών. Συχνά, ούτε οι καταναλωτές ούτε οι ρυθμιστικές αρχές έχουν ακριβή γνώση της σύνθεσης του προϊόντος, επομένως, σε πολλές περιπτώσεις δεν είναι σαφές εάν το προϊόν περιέχει νανοϋλικά και εάν ναι, σε ποια μορφή και συγκέντρωση. Όσον αφορά στην εκτίμηση ενός πιθανού περιβαλλοντικού ή υγειονομικού κινδύνου, η γνώση αυτή είναι απαραίτητη. Επίσης, αυτές οι πληροφορίες είναι εξίσου σημαντικές κατά τη διαδικασία της καταναλωτικής επιλογής. Κατά συνέπεια, οι οργανισμοί προστασίας του περιβάλλοντος και των καταναλωτών, καθώς και το κοινοβούλιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης απαιτούν μια συγκεκριμένη ρύθμιση των νανοϋλικών σύμφωνα με την αρχή της προφύλαξης καθώς και την υποχρεωτική σήμανση των προϊόντων (Kolahalam *et al.*, 2019).

Ο χαρακτηρισμός των νανοϋλικών βασίζεται στο μέγεθος, τη μορφολογία και το φορτίο τους, χρησιμοποιώντας τεχνικές μικροσκοπίας, όπως η μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM), η μικροσκοπία ηλεκτρονιακής σάρωσης (SEM) και η μικροσκοπία μεταφοράς ηλεκτρονίων (TEM). Ιδιότητες όπως η μορφολογία της επιφάνειας, το μέγεθος και το σχήμα καθορίζονται με τεχνικές ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας. Επίσης, χαρακτηριστικά όπως η φυσική σταθερότητα και η ικανότητα διασποράς του πολυμερούς, καθώς και η απόδοση τους *in vivo* επηρεάζονται από το φορτίο των νανοσωματιδίων, το οποίο είναι αναγκαίο να αξιολογείται πριν γίνει ο χαρακτηρισμός

τους, γιατί καθορίζει την αλληλεπίδρασή τους με το βιολογικό τους περιβάλλον και την ηλεκτροστατική τους αλληλεπίδραση με βιοδραστικές ενώσεις (Bhatia, 2016).

1.6 Οδοί έκθεσης

Δεδομένου ότι πολλά εμπορικά προϊόντα περιέχουν νανοϋλικά, η έκθεση ενός οργανισμού σε αυτά μπορεί να συμβεί με διάφορους τρόπους, με πιο κοινές οδούς την εισπνοή, την κατάποση και τη δερματική απορρόφηση (Teow *et al.*, 2011).



Εικόνα 1: Πιθανές οδοί έκθεσης, μετατόπισης και εναπόθεσης των νανοϋλικών. Η μετακίνηση και η συσσώρευσή τους εξαρτώνται από το είδος του οργανισμού και τις ιδιότητες του νανοϋλικού (Teow, Nair, Hande, & Valiyaveetil, 2011)

1.6.1 Έκθεση μέσω εισπνοής

Τα αερομεταφερόμενα νανοσωματίδια εισέρχονται στο ανθρώπινο σώμα μέσω των αναπνευστικών οδών. Μετά την εισπνοή, εναποτίθενται σε όλο το αναπνευστικό σύστημα, από τη μύτη έως τους πνεύμονες (Buzea, Pacheco and Robbie, 2007). Η συμπεριφορά των εισπνεόμενων νανοσωματιδίων διαφέρει σημαντικά από εκείνη των εισπνεόμενων αέριων ή πτητικών ενώσεων. Η εναπόθεση πτητικών ενώσεων στους πνεύμονες εξαρτάται κυρίως από την υδατοδιαλυτότητα της ένωσης, καθώς όσο πιο

υδατοδιαλυτή είναι, τόσο λιγότερο διεισδύει εντός αυτών. Αντιθέτως, η εναπόθεση των νανοσωματιδίων εξαρτάται κυρίως από την αεροδυναμική τους διάμετρο (Landsiedel *et al.*, 2014). Επιδημιολογικές ενδείξεις υποδεικνύουν ότι τα εισπνεόμενα νανοσωματίδια επηρεάζουν την ανθρώπινη υγεία (Singh and Nalwa, 2007). Ειδικότερα, η πρόσληψή τους οδηγεί σε ασθένειες που σχετίζονται με τους πνεύμονες, όπως για παράδειγμα το άσθμα και η βρογχίτιδα (Teow *et al.*, 2011). Νανοσωματίδια με διαστάσεις μικρότερες των 100 nm, τους, διαθέτουν τη δυνατότητα να τροποποιήσουν τον κίνδυνο για τις συγκεκριμένες ασθένειες λόγω των μοναδικών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους (Meldrum *et al.*, 2007). Η συστηματική διαθεσιμότητά τους μετά την εισπνοή εξαρτάται από το χρόνο έκθεσης, τη συγκέντρωσή τους, το μέγεθος, αλλά και την δυνατότητα συσσώρευσής τους. Πιο συγκεκριμένα, το μέγεθος των νανοϋλικών επηρεάζει την περιοχή εναπόθεσής τους στην αναπνευστική οδό, καθώς τα μικρότερου μεγέθους νανοσωματίδια εισχωρούν βαθύτερα και σε μερικές περιπτώσεις είναι δυνατόν να παραμείνουν εκεί για χρόνια. Εκτός από το γεγονός ότι διεισδύουν στις κυψελίδες και απορροφούνται από τους πνεύμονες, υπάρχει επίσης η πιθανότητα να ενεργοποιήσουν τα μακροφάγα, τα οποία είναι αδύνατον να αναγνωρίσουν εξαιρετικά μικρά μεγέθη της τάξης των 500 nm. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα νανοσωματίδια μπορούν να επηρεάσουν την φαγοκυττάρωση και να οδηγήσουν στην απόπτωση. Τέλος, νανοσωματίδια με μέγεθος μικρότερο των 400 nm έχουν μεγάλη πιθανότητα να διασχίσουν το φραγμό πνεύμονα-επιθηλίου, να εισέλθουν στο αίμα ή το λεμφικό σύστημα και στη συνέχεια να μεταφερθούν σε διάφορα όργανα (Teow *et al.*, 2011).

1.6.2 Έκθεση μέσω κατάποσης

Η πρόσληψη και η μετατόπιση των νανοϋλικών στο γαστρεντερικό σωλήνα συμβαίνει μέσω της κατανάλωσης τροφής και ποτών, αλλά και της πρόσληψης φαρμάκων. Γενικά, τα νανοσωματίδια, που χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων ή φάρμακα είναι πιθανό να απορροφηθούν από το σώμα μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα, μία από τις κύριες οδούς εισόδου τους. Στη συνέχεια, εισέρχονται στους λεμφικούς ιστούς, όπου βρίσκονται τα φαγοκύτταρα. Ορισμένες παράμετροι (π.χ. μέγεθος, φορτίο, συσσωματώματα) επηρεάζουν την απορρόφηση των νανοσωματιδίων από το γαστρεντερικό σωλήνα (Teow *et al.*, 2011). Αναλυτικότερα, έχει βρεθεί ότι τα θετικά φορτισμένα νανοσωματίδια παγιδεύονται στην αρνητικά φορτισμένη βλέννα, ενώ τα αρνητικά φορτισμένα νανοσωματίδια απορροφώνται εύκολα στο στρώμα βλέννας

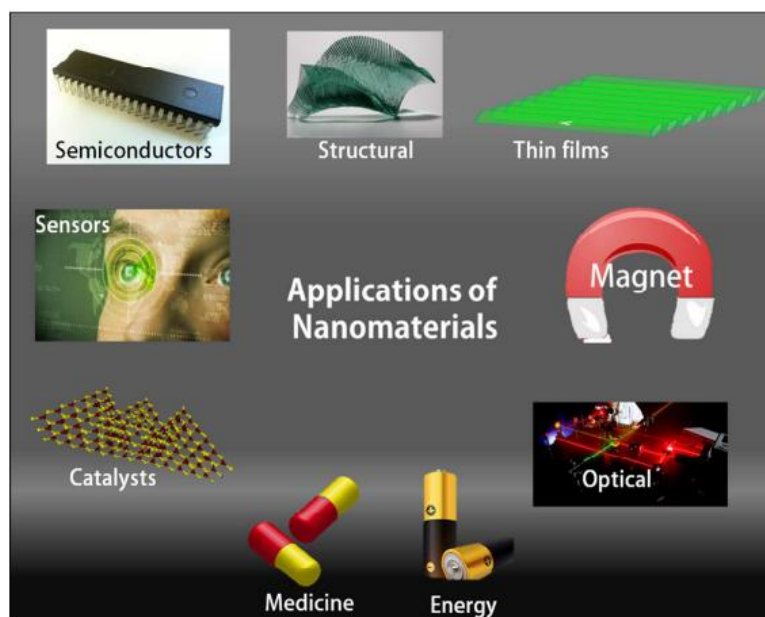
(Szentkuti, 1997). Τα νανοσωματίδια που έχουν απορροφηθεί μπορούν να αποβληθούν σε περίπτωση που είναι ασταθή ή έχουν υποστεί χημικές τροποποιήσεις στο γαστρεντερικό σωλήνα (Teow *et al.*, 2011). Όσον αφορά στο ρυθμό απορρόφησης των νανοϋλικών, έχει παρατηρηθεί ότι είναι ανάλογος του μεγέθους τους (Szentkuti, 1997). Αλλαγές στο pH οδηγούν στη δημιουργία συσσωματωμάτων στο εσωτερικό του εντέρου. Τα μικρού μεγέθους συσσωματώματα μπορούν εύκολα να απομακρυνθούν, ωστόσο τα μεγαλύτερα αποφράζουν τον γαστρεντερικό σωλήνα, επηρεάζουν άλλα όργανα, ενώ μπορεί να οδηγήσουν ακόμα και στο θάνατο (Teow *et al.*, 2011).

1.6.3 Έκθεση μέσω του δέρματος

Το δέρμα αποτελεί ένα φυσικό φραγμό ανάμεσα στο ανθρώπινο σώμα και το περιβάλλον και ως εκ τούτου αξιοποιείται για την εκτίμηση της δερματικής τοξικότητας ή της περιβαλλοντικής έκθεσης σε χημικές ουσίες. Σήμερα, λόγω της αυξανόμενης χρήσης της νανοτεχνολογίας, σημαντικό ρόλο παίζει η δερματική έκθεση τόσο στην εργασία, όσο και κατά την επαφή με εμπορικά προϊόντα (Monteiro-Riviere and Riviere, 2009). Το δέρμα είναι ένα από τα μεγαλύτερα όργανα στο ανθρώπινο σώμα και αποτελείται από δύο στρώματα: την επιδερμίδα και το χόριο. Οι τρόποι με τους οποίους ένα χημικό μπορεί να το διασχίσει είναι η ενδοκυτταρική οδός με διαχωρισμό στη λιπιδική μήτρα, η ενδοκυτταρική οδός, μέσω των ιδρωτοποιών αδένων και μέσω του θύλακα της τρίχας (Larese Filon *et al.*, 2015). Πιο συγκεκριμένα, η έκθεση και η απορρόφηση των νανοϋλικών μπορεί να συμβεί μέσω διείσδυσης στους ιδρωτοποιούς αδένες και στους θύλακες της τρίχας. Έχει βρεθεί ότι τα μεταλλικά νανοσωματίδια μεγέθους μικρότερου των 10 nm μπορούν να διεισδύσουν στο θύλακα της τρίχας και την κεράτινη στιβάδα και να φτάσουν στην επιδερμίδα, χωρίς ωστόσο να διαπερνούν το δέρμα (Singh and Nalwa, 2007). Ποικίλες παράμετροι όπως τα ρούχα, αλλά και η ηλικία, η δόση, ο τύπος και η κατάσταση του δέρματος επηρεάζουν την απορρόφηση των νανοσωματιδίων. Γενικά, το ανθρώπινο δέρμα αποτελεί ένα σημαντικό φραγμό έναντι της εισόδου των νανοσωματιδίων και άλλων χημικών εντός του ανθρώπινου οργανισμού. Η κεράτινη στιβάδα απομακρύνει αποτελεσματικά τα ξένα σωματίδια, σε αντίθεση με τους ιδρωτοποιούς αδένες και τους θύλακες της τρίχας, που καθιστούν το συγκεκριμένο φραγμό πιο ευάλωτο. Εντούτοις, κατά κύριο λόγο τα νανοσωματίδια εισχωρούν μέσω κάποιου τραυματισμού του δέρματος (Teow *et al.*, 2011).

1.7 Εφαρμογές νανοϋλικών

Τα νανοϋλικά όλων των διαστάσεων (0D, 1D, 2D και 3D) χρησιμοποιούνται εκτενώς σε ποικίλες εφαρμογές, με κυριότερη τη χρήση νανοσωματιδίων των μετάλλων. Επί παραδείγματι, νανοσωματίδια μετάλλων αξιοποιούνται για την επεξεργασία και αποκατάσταση των υπόγειων υδάτων (Ganguly, Breen and Pillai, 2018). Σε αυτό το πλαίσιο, τα νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου είναι τα πλέον διαδεδομένα στην απομάκρυνση βαρέων μετάλλων από τα ύδατα, μιας και έχουν μικρό μέγεθος, μεγάλη επιφάνεια και μαγνητικές ιδιότητες, με αποτέλεσμα τον εύκολο και άμεσο διαχωρισμό των προσροφημένων συστατικών από το υδάτινο οικοσύστημα (Dave and Chopda, 2014). Επίσης, μία αρκετά διαδεδομένη εφαρμογή νανοσωματιδίων των μετάλλων είναι η χρήση τους σε συσκευές μνήμης εξαιτίας των μαγνητικών τους ιδιοτήτων. Οι μαγνητικές ιδιότητες εξαρτώνται βέβαια σε μεγάλο βαθμό από τον όγκο, την επιφάνεια και τα άτομα της νανοδομής τους (Chen *et al.*, 2018). Παράλληλα, τα νανοσωματίδια των μετάλλων, λόγω των οπτικών, θερμικών, ηλεκτρικών και καταλυτικών ιδιοτήτων τους χρησιμοποιούνται σε ηλεκτροχημικούς, αλλά και φθορίζοντες αισθητήρες για την ανίχνευση βιομορίων και μεταλλικών ιόντων, καθότι χαρακτηρίζονται από εξαιρετική φωτο-σταθερότητα (Huang *et al.*, 2015). Τα νανοσωματίδια τιτανίου βρίσκουν εφαρμογή σε αντηλιακά και χρώματα (Ganguly, Breen and Pillai, 2018), στον καθαρισμό του νερού, την αφαίρεση του βενζοθειοφαινίου από τα καύσιμα diesel και την αποικοδόμηση των ατμοσφαιρικών ρύπων (Reijnders, 2008; Ganguly, Breen and Pillai, 2018). Επιπροσθέτως, τα νανοσωματίδια πυριτίου αξιοποιούνται σε ηλεκτρονικές βιομηχανίες και τα νανοσωματίδια οξειδίου του ψευδαργύρου χρησιμοποιούνται ως επιστρώματα σε οθόνες, σε πλαστικά και υφάσματα (Ganguly, Breen and Pillai, 2018), στη συσκευασία τροφίμων, αλλά ακόμα και ως πρόσθετο τροφίμων, αναγνωρισμένο από τον FDA (Espitia *et al.*, 2012). Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα είναι η εφαρμογή των νανοσωματιδίων πυριτίου σε διαγνωστικά και θεραπευτικά εργαλεία για τον καρκίνο και άλλες ασθένειες, καθώς και η χρήση τους στη γονιδιακή θεραπεία και τη μεταφορά φαρμάκων (Wang, Zhao and Tan, 2008). Τέλος, τα νανοσωματίδια αργύρου επικεντρώνονται κυρίως στη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου, αν και βρίσκουν επίσης πληθώρα εφαρμογών, όπως ως αντιβακτηριακά, αντιμυκητιακά, αντικά, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινικά μέσα (Abou El-Nour *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2016; Ganguly, Breen and Pillai, 2018).



Εικόνα 2: Εφαρμογές των νανοϋλικών (Ganguly, P., Breen, A. and Pillai, S. C. 2018)

2. Νανοτοξικολογία

Η νανοτοξικολογία αποτελεί ένα σημαντικό, καινοτόμο και διαρκώς αναπτυσσόμενο πεδίο (Farré *et al.*, 2009). Είναι ένας κλάδος της τοξικολογίας, που ασχολείται με τις τοξικές επιδράσεις που επάγονται από δομές ή σωματίδια της νανοκλίμακας, δηλαδή με διάμετρο μικρότερη των 100 nm. Γενικά, η ενισχυμένη τοξικότητα ορισμένων νανοϋλικών σε σύγκριση με τα αντίστοιχα υλικά μεγαλύτερης κλίμακας προκύπτει από το γεγονός ότι τα νανοσωματίδια έχουν πολύ υψηλό λόγο επιφανείας προς όγκο (S / V), γεγονός που τα καθιστά εξαιρετικά δραστικά. Φυσικά αυτό σχετίζεται και με την ταυτόχρονη παρουσία άλλων χημικών, καθώς και με το φυσιολογικό περιβάλλον των διαφορετικών ιστών του ανθρώπινου σώματος. Συνεπώς, το επιστημονικό πεδίο της νανοτοξικολογίας ασχολείται με την ταξινόμηση των συνθηκών, οι οποίες οδηγούν σε τοξικές επιδράσεις των νανοϋλικών, καθώς και με την εύρεση τρόπων πρόληψης και αντιμετώπισης αυτών. Ένας από τους πιο βασικούς σκοπούς της νανοτοξικολογίας είναι ο καθορισμός των ιδιοτήτων της νανοκλίμακας οι οποίες είναι υπεύθυνες για την εκδήλωση της τοξικότητας (Singh, *et al.*, 2019). Ως εκ τούτου, η νανοτοξικολογία εισάγει πρωτόκολλα για την τοξικότητα, που προκαλείται από τα νανοϋλικά και περιλαμβάνει την κατανόηση των φυσικοχημικών επιδράσεων και των

μηχανισμών έκθεσης για την αξιολόγηση της τοξικότητας τόσο στον άνθρωπο, όσο και στο περιβάλλον (Ganguly, Breen, & Pillai, 2018).

2.1 Είδη τοξικότητας

2.1.1 Κυτταροτοξικότητα

Η κυτταροτοξικότητα αναφέρεται στην ικανότητα διαφόρων ουσιών να προκαλούν καταστροφή του κυττάρου και αποτελεί ένα από τα κυρίαρχα αποτελέσματα τοξικότητας που παρατηρούνται στους ζωντανούς οργανισμούς. Η έκθεση των κυττάρων σε τοξικές ενώσεις συχνά προκαλεί διάφορα θανατηφόρα αποτελέσματα, όπως την πλήρη κυτταρική διάσπαση, τη ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης και την καταστροφή των συστατικών στο κυτοσόλιο. Επίσης, μπορεί να οδηγήσει σε επαγωγή της απόπτωσης, γεγονός που θα μπορούσε να μειώσει τον ρυθμό ανάπτυξης δηλαδή να μειώσει τον αριθμό των κυττάρων ή τις πιθανότητες βιωσιμότητας και πολλαπλασιασμού τους (Ganguly, Breen and Pillai, 2018). Η έννοια της κυτταροτοξικότητας είναι ιδιαίτερα σημαντική, δεδομένου ότι είναι ευκολότερο να προσδιοριστεί *in vitro* ο κυτταρικός θάνατος ή κάποια μεταβολική αλλαγή παρά αλλαγές στη φυσιολογία. Επιπροσθέτως, οι διαδικασίες προσδιορισμού της κυτταροτοξικότητας είναι εύκολες, φθηνές και επαναλήψιμες (Freshney, 2011).

2.1.2 Γενοτοξικότητα

Η γενοτοξικότητα αναφέρεται στην ικανότητα ποικίλων ουσιών να προκαλούν βλάβες στα κύτταρα, μέσω της αλληλεπίδρασης τους με το κυτταρικό γενετικό υλικό. Ειδικότερα, τα υλικά που προκαλούν βλάβη στην ακεραιότητα του γενετικού υλικού στο εσωτερικό του κυττάρου είναι γνωστά ως γενοτοξίνες. Η γενοτοξικότητα μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλάξεις του DNA όπως επανάληψεις, απαλοιφές, κ.ά. (Ganguly, Breen and Pillai, 2018). Ωστόσο, βλάβες στο DNA ή μεταλλάξεις είναι δυνατόν να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο ή ακόμα και καρκινογένεση. Τα νανοϋλικά, εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους, μπορούν να διασχίσουν την πυρηνική μεμβράνη και να αλληλεπιδράσουν με το γενετικό υλικό των κυττάρων. Αναλυτικότερα, αφού διαχυθούν από την πυρηνική μεμβράνη ή μεταφερθούν μέσω του συμπλέγματος των πυρηνικών πόρων και εγκατασταθούν στον πυρήνα αλληλεπιδρούν με το DNA, αλλά και με πυρηνικές πρωτεΐνες (Saifi, Khan and Godugu, 2018). Η βλάβη στο γενετικό υλικό μπορεί να προκύψει είτε μέσω πρωτογενών (άμεσων / έμμεσων) είτε μέσω

δευτερογενών μηχανισμών (Evans *et al.*, 2017). Η άμεση βλάβη του DNA γίνεται με εντοπισμό του νανοϋλικού στον πυρήνα ενός κυττάρου, που δίνει τη δυνατότητα να αλληλεπιδράσει και να καταστρέψει το DNA. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε μεταλλάξεις ή σχηματισμό βλαβών στο DNA. Αντίθετα, η έμμεση γενοτοξικότητα θεωρείται ότι προκύπτει μέσω εμπλοκής του οξειδωτικού στρες (Saifi, Khan and Godugu, 2018). Παράλληλα, η δευτερογενής γενοτοξικότητα προκύπτει *in vivo* ως αποτέλεσμα της χρόνιας φλεγμονής που προκαλείται από την ενεργοποίηση ανοσοκυττάρων, όπως μακροφάγα ή / και ουδετερόφιλα.

Τα νανοϋλικά αλληλεπιδρούν και με άλλα μόρια που επηρεάζουν την αντιγραφή του DNA και την κυτταρική διαίρεση και μπορεί να προκαλέσουν εκτός από βλάβες του γενετικού υλικού, γενετικές μεταλλάξεις και χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Bartek, Mistrik and Bartkova, 2010). Οι ανωμαλίες στα χρωμοσώματα είναι άμεση συνέπεια της καταστροφής του DNA, όπως ρήγματα στην διπλή του έλικα, μη επιδιόρθωση των ρηγμάτων και τελικά την αναδιάταξη των χρωμοσωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, σχηματίζονται μικροπυρήνες στα υπό διαίρεση κύτταρα από θραύσματα χρωμοσωμάτων ή ολόκληρα χρωμοσώματα, τα οποία δεν μπορούν να ενταχθούν στον μιτωτικό άξονα κατά τη διάρκεια της μίτωσης (Teow *et al.*, 2011).

2.1.3 Οικοτοξικότητα

Η οικοτοξικότητα αναφέρεται στην επίδραση της τοξικότητας σε ολόκληρο το οικοσύστημα, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων. Μεταξύ των οικοτοξινών περιλαμβάνονται προϊόντα ανθρωπογενούς προέλευσης, όπως τα νανοϋλικά, οι υδρογονάνθρακες και τα φυτοφάρμακα. Αυτές οι τοξικές ενώσεις εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα μέσω βιοσυγκέντρωσης και ακολούθως μεταφέρονται σε υψηλότερες τάξεις, επηρεάζοντας τα κύτταρα και το γενετικό υλικό των ζωντανών οργανισμών, οδηγώντας τελικά στην επαγωγή κυτταροτοξικότητας και γενοτοξικότητας (Ganguly, Breen and Pillai, 2018). Τα νανοϋλικά εξαιτίας των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων τους προκαλούν έντονη ανησυχία για τις δυσμενείς επιπτώσεις που επάγουν τόσο στα βιολογικά συστήματα όσο και στο περιβάλλον (Oberdörster, Oberdörster and Oberdörster, 2005). Επί του παρόντος, έχει διεξαχθεί πληθώρα μελετών σχετικά με την οικοτοξικότητα των νανοϋλικών, χρησιμοποιώντας ανώτερους οργανισμούς, όπως ιχθύες και μύες, καθώς και άλλα είδη αποδεκτά από τους ρυθμιστικούς οργανισμούς για χρήση ως μοντέλα σε δοκιμές οικοτοξικότητας.

Βέβαια, τα αποτελέσματα σχετίζονται με τον εκάστοτε οργανισμό-στόχο και ως εκ τούτου είναι απαραίτητες οι μελέτες σε ποικιλία οργανισμών, προκειμένου να γίνει ασφαλής εξαγωγή συμπερασμάτων (Barrena *et al.*, 2009).

2.2 Μηχανισμοί τοξικότητας των νανοϋλικών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η μεγάλη ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας έχει προκαλέσει αλλαγές στη χρήση της επιστήμης και της τεχνολογίας σε ποικίλους τομείς. Σε αυτό το πλαίσιο, η χρήση των νανοϋλικών έχει επεκταθεί σημαντικά χωρίς ωστόσο να έχουν επιλυθεί πλήρως ζητήματα που αφορούν στην ασφάλεια τους. Με βάση τις υπάρχουσες επιστημονικές ενδείξεις η τοξικότητά τους οφείλεται κυρίως σε μηχανισμούς, που επάγουν το σχηματισμό ROS, χωρίς ωστόσο να παραλείπεται και η επίδραση άλλων μηχανισμών, όπως η απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών, η βλάβη στην κυτταρική μεμβράνη, οι βλάβες στο DNA, ο αλλοιωμένος κυτταρικός κύκλος, η ενεργοποίηση των πυρηνικών παραγόντων NF-kB και MAPK, ο μετασχηματισμός στη σηματοδότηση του αυξητικού παράγοντα β, αλλά και οι βλάβες σε οργανίδια. Στην πραγματικότητα, η τοξικότητα των νανοϋλικών πιστεύεται ότι είναι συνέπεια της αλληλεπίδρασης των προαναφερθέντων μηχανισμών (Manke, Wang and Rojanasakul, 2013; Fu *et al.*, 2014) και εξαρτάται τόσο από τη δόση και τον χρόνο έκθεσης (Jeevanandam *et al.*, 2018). Παρακάτω, ακολουθεί μια συνοπτική αναφορά στις ROS και το οξειδωτικό στρες, καθώς και στη σχετιζόμενη με το οξειδωτικό στρες τοξικότητα που επάγουν τα νανοϋλικά.

2.3 Δημιουργία ROS

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα μόριο ή άτομο, που διαθέτει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους, και σε αυτό ή αυτά οφείλεται η υψηλή δραστηριότητά τους. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκύψουν από πολλά στοιχεία, εντούτοις στα βιολογικά συστήματα οι πιο σημαντικές είναι εκείνες που περιλαμβάνουν ως κεντρικό άτομο οξυγόνο (ROS) και άζωτο (RNS) (Storz and Imlay, 1999). Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου, αναφέρεται σε ελεύθερες ρίζες και μη ριζικά ενδιάμεσα προϊόντα με βάση το οξυγόνο, με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια, τα οποία μπορούν να υπάρχουν ως ανεξάρτητες οντότητες (Handa *et al.*, 2016).

Οι ROS αποτελούν μια ομάδα οξειδωτικών μέσων, που περιλαμβάνουν τις ρίζες σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), υδροξυλίου (OH^{\cdot}), περοξυλίου (ROO^{\cdot}), αλκοξυλίου (RO^{\cdot}), υδροπεροξυλίου (HO_2^{\cdot}), καθώς και τις μη ρίζες υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$), υποβρωμιώδες οξύ ($HOBr$), όζον (O_3) και μονήρες οξυγόνο (1O_2). Οι ROS δημιουργούνται τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς παράγοντες (Vallyathan and Shi, 1997; Thannickal and Fanburg, 2000). Εκτός από τις ROS υπάρχουν και άλλα είδη δραστικών μορφών, οι οποίες διαφέρουν ως προς το είδος του κεντρικού τους ατόμου και έχουν με τη σειρά τους αξιοσημείωτες επιδράσεις στην οξειδοαναγωγική ικανότητα και κατ' επέκταση στο οξειδωτικό στρες (Del Río, 2015). Σε αυτές περιλαμβάνονται οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS), οι δραστικές μορφές θείου (RSS), οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCIS), οι δραστικές μορφές καρβονυλίου (RCS) και οι δραστικές μορφές σεληνίου (RSeS) (Sies, Berndt and Jones, 2017).

Η μεγαλύτερη ποσότητα ελευθέρων ριζών παράγεται ενδογενώς κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, που πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Di Meo and Venditti, 2001). Το μοριακό οξυγόνο παράγει τις πρωτογενείς ROS μέσω αναγωγής ενός ηλεκτρονίου που καταλύεται από το NADPH. Επιπλέον, η αναγωγή του οξυγόνου μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία H_2O_2 ή OH^{\cdot} μέσω της μιτοχονδριακής υπεροξειδικής δισμουτάσης ή της αντίδρασης Fenton, αντίστοιχα (Vallyathan and Shi, 1997; Thannickal and Fanburg, 2000). Άλλες ενδογενείς πηγές είναι η μιτοχονδριακή αναπνοή, η φλεγμονώδης απόκριση, τα μικροσώματα και τα υπεροξειδισώματα. Αντιθέτως, η επίδραση των νανοϋλικών και οι περιβαλλοντικοί ρύποι ανήκουν στις εξωγενείς πηγές παραγωγής ROS. Μια ποικιλία νανοϋλικών συμπεριλαμβανομένων των νανοσωματιδίων μεταλλικών οξειδίων επάγουν την παραγωγή ROS, αποτελώντας έναν από τους κύριους μηχανισμούς πρόκλησης κυτταροτοξικότητας.

2.3.1 Θετικές επιδράσεις των ROS

Παρόλο που οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στις επιβλαβείς επιδράσεις των ελευθέρων ριζών, δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις που οι ROS συμμετέχουν σε φυσιολογικές διεργασίες του οργανισμού. Γενικά, οι ROS, αποτελούν βασικά μόρια που συμμετέχουν στη διαδικασία της κυτταρικής σηματοδότησης και της διατήρησης της ομοιόστασης. Η παρουσία τους είναι ιδιαίτερα σημαντική στο ανθρώπινο σώμα,

καθώς εμπλέκονται σε αρκετές διαδικασίες του μεταβολισμού, αλλά η διακύμανση των ROS στο κυτταρικό περιβάλλον μπορεί να προκαλέσει αλλαγές σε κυτταρικά συμβάντα, όπως είναι η μεταγωγή σήματος και το δυναμικό οξειδοαναγωγής των πρωτεϊνών (Ganguly, Breen and Pillai, 2018). Επίσης, οι ROS συμβάλλουν στην ανοσία του οργανισμού, καθώς δρουν ενάντι των αντιγόνων κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης (Jenkins, 1988). Ακόμα, ο σημαντικός ρόλος τους γίνεται εμφανής κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, η οποία μπορεί να προκληθεί από έντονη σωματική άσκηση και από τραυματισμό (Malm, 2001). Παράλληλα, οι ROS συμμετέχουν στην κυτταρική σηματοδότηση και στη βιογένεση κυττάρων, καθώς λειτουργούν ως κυτταρικοί αγγελιαφόροι ή τροποποιούν την κατάσταση οξειδοαναγωγής (Sen and Packer, 1996; Sen, 2001). Επιπροσθέτως, συμβάλλουν στην αποτοξίνωση των φαρμάκων και στην ενζυμική δραστηριότητα (Jenkins, 1988). Τέλος, συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη μυϊκή συστολή και την έκφραση γονιδίων (Ji, 1999).

2.3.2 Αρνητικές επιδράσεις των ROS

Παρά τις ευεργετικές επιδράσεις τους οι ROS εμφανίζουν και επιβλαβείς επιδράσεις. Αρχικά, είναι δυνατόν να οδηγήσουν υγιή κύτταρα σε απόπτωση και να προκαλέσουν φλεγμονή ή να επηρεάσουν άλλες βασικές κυτταρικές λειτουργίες (Finaud, Lac and Filaire, 2006). Επιπροσθέτως, η υπέρμετρη παραγωγή ελευθέρων ριζών ευθύνεται για τη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Halliwell and Gutteridge, 1999), τη μυϊκή καταστροφή (Nikolaidis *et al.*, 2008) και την κόπωση (Betters *et al.*, 2004). Ακόμη, όταν τα μιτοχόνδρια εργάζονται έντονα για την παραγωγή ATP από το ADP, όπως συμβαίνει κατά τη διάρκεια της άσκησης, το ποσοστό οξυγόνου, που μετατρέπεται σε ελεύθερες ρίζες μειώνεται περίπου στο ένα δέκατο του ποσοστού κατά την ηρεμία (Vinña *et al.*, 2001). Οι ελεύθερες ρίζες, επίσης, οξειδώνουν διάφορα βιομόρια και πιο συγκεκριμένα τα λιπίδια των μεμβρανών, τις πρωτεΐνες και το DNA. Τέλος, έχουν συσχετιστεί με την παθοφυσιολογία διάφορων ασθενειών, όπως τη νόσο Parkinson, τη νόσο Alzheimer, την κατάθλιψη, αλλά και τη γήρανση (Finaud, Lac and Filaire, 2006).

2.4 Οξειδωτικό στρες

Η πρόωμη χρήση του όρου «οξειδωτικό στρες» χρονολογείται ήδη από το 1956 και τη χημεία των ελαστικών (Ore, 1956), ενώ από το 1985 συνδυάστηκε με την οξειδωτική

βλάβη που προκαλεί στα κύτταρα και τα όργανα (Sies and Cadenas, 1985). Ωστόσο, μετά την κατανόηση των προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών, της ενδογενούς και εξωγενούς δράσης τους, αλλά και το ρόλο της οξειδοαναγωγικής κυτταρικής σηματοδότησης ο ορισμός του οξειδωτικού στρες χρειάστηκε να τροποποιηθεί (Sies, Berndt and Jones, 2017). Πλέον ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων, η οποία οδηγεί σε διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ελέγχου ή/ και μοριακή βλάβη (Sies and Jones, 2007).

Το οξειδωτικό στρες επιτρέπει την ενεργοποίηση πολλών οδών οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται και οι καταρράκτες MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases). Αυτοί οι πρωτεϊνικοί καταρράκτες είναι υπεύθυνοι για διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση, ενώ επίσης συμμετέχουν στην έκφραση των προφλεγμονωδών κυτοκινών, των χημειοκινών και άλλων μορίων προσκόλλησης. Επιπροσθέτως, σε χαμηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες ενεργοποιείται ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2, ο οποίος εμπλέκεται στην έκφραση αντιοξειδωτικών, κυτταροπροστατευτικών και αντιφλεγμονωδών ενζύμων.

Τα αντιοξειδωτικά είναι ενδογενή και εξωγενή μόρια, που δρουν για την καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες στο κύτταρο. Υπάρχουν δύο τύποι αντιοξειδωτικών, αυτά που συμμετέχουν στην πρωταρχική άμυνα (υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση, αναγωγή της θειορεδοξίνης) και αυτά της δευτερογενούς άμυνας (ανηγμένη γλουταθειόνη). Η γλουταθειόνη είναι μία μη πρωτεϊνική θειόλη, η οποία διατηρεί τα επίπεδα της κυτταρικής οξειδοαναγωγής και συναντάται σε δύο μορφές, την οξειδωμένη (GSSG) και την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH). Η εναλλαγή αυτών των δύο μορφών οφείλεται στο ένζυμο αναγωγή της γλουταθειόνης (Ganguly, Breen and Pillai, 2018).

2.7 Νανοϋλικά & ROS

Η παραγωγή ROS είναι ένα συχνό αποτέλεσμα που προκύπτει από την έκθεση σε νανοϋλικά. Τα νανοϋλικά διαφόρων χημικών συνθέσεων, όπως τα φουλλερένια και τα οξείδια των μετάλλων έχει φανεί ότι σχετίζονται με την πρόκληση οξειδωτικού στρες (Vallyathan and Shi, 1997). Οι βασικοί παράγοντες, που εμπλέκονται στην επαγωγή οξειδωτικού στρες περιλαμβάνουν τις προ-οξειδωτικές λειτουργικές ομάδες

στην ενεργή επιφάνεια του νανοϋλικού, τον ενεργό κύκλο οξειδοαναγωγής στην επιφάνεια του νανοϋλικού και τις αλληλεπιδράσεις νανοϋλικού-κυττάρου. Οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται στην επιφάνεια του νανοϋλικού, όταν τόσο τα οξειδωτικά μόρια, όσο και οι ελεύθερες ρίζες συνδέονται με την επιφάνεια των νανοσωματιδίων (Knaapen *et al.*, 2004). Οι δεσμευμένες ρίζες της επιφανείας είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό ROS, όπως οι ρίζες $\text{OH}\cdot$, ενώ το O_3 και το NO_2 , που είναι προσροφημένα στην επιφάνειά τους είναι ικανά να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη (Buzea, Pacheco and Robbie, 2007). Το μειωμένο μέγεθος των νανοσωματιδίων οδηγεί σε δομικά ελαττώματα και αλλοιωμένες ηλεκτρονικές ιδιότητες στην επιφάνειά τους, δημιουργώντας ενεργές ομάδες, όπου οι δότες ή δέκτες ηλεκτρονίων αλληλεπιδρούν με το μοριακό O_2 , το οποίο με τη σειρά του μπορεί να δημιουργήσει επιπλέον ROS μέσω αντιδράσεων τύπου Fenton (Nel *et al.*, 2006). Οι ελεύθερες ρίζες συνδέονται άμεσα με την επιφάνεια του νανοσωματιδίου ή μπορούν να δημιουργηθούν ως ελεύθερες οντότητες σε ένα υδατικό εναιώρημα (Fubini and Hubbard, 2003). Η διάλυση του νανοσωματιδίου και η επακόλουθη απελευθέρωση μεταλλικών ιόντων μπορούν να ενισχύσουν το σχηματισμό ROS. Εκτός από τις εξαρτώμενες από την επιφάνεια ιδιότητες, τα μέταλλα και οι χημικές ενώσεις στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων επιταχύνουν την παραγωγή ROS, καθώς μέταλλα όπως ο σίδηρος (Fe), ο χαλκός (Cu), το χρώμιο (Cr), το βανάδιο (V) και το πυρίτιο (Si) εμπλέκονται στην παραγωγή ROS μέσω μηχανισμών όπως οι αντιδράσεις τύπου Haber-Weiss και Fenton (Knaapen *et al.*, 2004).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι ROS παράγονται από αρκετούς κυτταρικούς τύπους είτε ως μία φυσιολογική διεργασία είτε ως απόκριση στο στρες και στην έκθεση του κυττάρου σε βιοϋλικά, όπως για παράδειγμα τα νανοϋλικά (Palazzolo-Ballance, Suquet and Hurst, 2007). Δεδομένου ότι τα φαγοκύτταρα είναι το κυρίαρχο μοντέλο κυττάρων για την εκτίμηση της τοξικότητας των νανοϋλικών, πολλές δοκιμές εξετάζουν την παραγωγή ROS σε αυτά (Jones and Grainger, 2009). Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι στην περίπτωση μελέτης της τοξικότητας του μαύρου άνθρακα και των νανοσωματιδίων από οξείδια του τιτανίου απαιτείται να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή, καθώς είναι ικανά να οδηγήσουν στην παραγωγή ROS σε μη κυτταρικά συστήματα (Duffin, Mills and Donaldson, 2007).

Για την εκτίμηση της επαγωγής τοξικότητας μέσω οξειδωτικού στρες γίνεται άμεσος ποσοτικός προσδιορισμός των ROS στα κύτταρα ή ποσοτικός προσδιορισμός των

επιπτώσεων στα κύτταρα ή προσδιορισμός άλλων βιοχημικών αντιδράσεων σε αυτά (Jones and Grainger, 2009). Η άμεση μέτρηση των ROS στα κύτταρα μπορεί να γίνει είτε με βάση κάποιο φθοροφόρο είτε με ηλεκτρονικό παραμαγνητικό συντονισμό (EPR) (Jones and Grainger, 2009). Στην πρώτη περίπτωση παρατηρείται φθορισμός των ενεργών ανιχνευτών φλουορεσκεϊνης όταν οξειδώνονται από τις ROS, δίνοντας μια οπτική απόκριση εξαρτώμενη από τις συγκεντρώσεις των ROS (Wilson *et al.*, 2002). Στη δεύτερη περίπτωση υπάρχει η δυνατότητα μεγαλύτερης ποικιλίας πειραματικών ελέγχων, καθώς με το EPR γίνεται η ανίχνευση ριζών παρουσία ή απουσία κυττάρων (Jones and Grainger, 2009).

Τα περισσότερα κύτταρα διαθέτουν ενσωματωμένες άμυνες για την εξουδετέρωση των ROS χρησιμοποιώντας τη γλουταθειόνη, έναν ενδογενή, αναγωγικό παράγοντα. Έτσι, τα επίπεδα των ROS, που παράγονται ενδοκυτταρικά μπορούν να παρατηρηθούν επίσης έμμεσα μέσω δοκιμασιών προσδιορισμού της γλουταθειόνης (Jones and Grainger, 2009). Άλλες δοκιμασίες είναι ικανές να ποσοτικοποιούν καταστροφές στα κύτταρα, όπως σε κυτταρικές μεμβράνες και στο DNA, που προκαλούνται από τα υψηλά επίπεδα των ROS (Schins *et al.*, 2002). Ακόμη, η λιπιδική υπεροξείδωση που οφείλεται στις ROS και μπορεί να παρατηρηθεί τόσο σε κυτταρικό επίπεδο όσο σε επίπεδο οργάνων και ιδιαίτερα στις μιτοχονδριακές μεμβράνες καταδεικνύει τη μιτοχονδριακή βλάβη ως ένα δείκτη αυξημένων ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS (Choi *et al.*, 2007).

3. In vitro δοκιμές

Οι in vitro μέθοδοι βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στον τομέα της νανοτοξικολογίας, καθώς η χρήση τους μπορεί να παράγει αναπαραγώγιμα αποτελέσματα γρήγορα και φθηνά χωρίς τη χρήση ζωικών οργανισμών. Ειδικότερα, απλές δοκιμασίες in vitro που προσφέρουν εξειδικευμένες και ποσοτικές μετρήσεις τοξικότητας είναι εξαιρετικά πολύτιμες για την αρχική αξιολόγηση της αναμενόμενης βιοσυμβατότητας νέων νανοσωματιδίων. Γενικά, τα πειράματα in vitro ήταν ανέκαθεν η πρώτη επιλογή για τους τοξικολόγους, δεδομένου ότι απαιτούν ελάχιστο χρόνο και είναι σχετικά οικονομικά. Παρά το γεγονός ότι δεν μπορούν να αντικαταστήσουν πλήρως τα πειράματα με ζώα, διασφαλίζουν τη χρήση δοκιμών in vivo μόνο όταν αυτό κρίνεται αναγκαίο και αναπόφευκτο, ενώ παράλληλα παρέχουν σημαντικές, ωστόσο

ενδεικτικές, πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητα των ναουλικών (Sharifi *et al.*, 2012)

Η εκτίμηση κινδύνου για διάφορες πτυχές της ναυτεχνολογίας βρίσκεται ακόμη στα αρχικά στάδια. Γι' αυτό το λόγο, οι περισσότερες μελέτες, που αφορούν στην τοξικότητα των ναουλικών περιορίζονται στις κλασικές μεθόδους δοκιμής τοξικότητας *in vitro*, που χρησιμοποιούνται ήδη για φάρμακα και άλλες χημικές ουσίες. Ωστόσο, στην παραδοσιακή τοξικολογία χρησιμοποιούνται μέθοδοι που δεν μπορούν να αξιοποιηθούν για την αξιολόγηση της τοξικότητας των ναουλικών, εξαιτίας των μοναδικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους (Dhawan and Sharma, 2010).

Η *in vitro* εκτίμηση της τοξικότητας περιλαμβάνει ένα σύνολο τεχνικών, που προορίζονται για τον έλεγχο πιθανών τοξικών ουσιών. Οι μελέτες αυτές βοηθούν στον υπολογισμό των ορίων της δόσης και της πρόβλεψης της ανταπόκρισης στο εκάστοτε εξεταζόμενο ξενοβιοτικό (Wataha, Hanks and Craig, 1991). Οι δοκιμές *in vitro* είναι οι πλέον συνιστώμενες, καθώς περιλαμβάνουν αποδοτικές τεχνικές με γρήγορα αποτελέσματα, ενώ αποφεύγουν προβλήματα που σχετίζονται με ηθικά ζητήματα, καθώς δε χρησιμοποιούνται ζωντανοί οργανισμοί. Επιπλέον, μιμούνται κυτταρικά συμβάντα του ανθρωπίνου σώματος μετά από την έκθεση σε οποιαδήποτε τοξική ουσία. Ωστόσο παρουσιάζουν και κάποια μειονεκτήματα, καθώς πολλές φορές δεν προσομοιάζουν επαρκώς αυτά τα κυτταρικά συμβάντα, όπως συμβαίνει στους ζωντανούς οργανισμούς. Ο μηχανισμός δράσης του ξενοβιοτικού, η ανταπόκριση σε αυτό και τα τελικά σημεία (endpoints) είναι εξαιρετικά κρίσιμα και χρήζουν επιπλέον μελετών. (Dhawan and Sharma, 2010)

Οι *in vitro* μελέτες που χρησιμοποιούν τεχνητά κυτταρικά συστήματα παίζουν σημαντικό ρόλο στη διεξαγωγή μελετών τοξικότητας με ένα μεγάλο εύρος χημικών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, περιλαμβάνουν ποικίλες δοκιμασίες με διαφορετικά τελικά σημεία, όπως δοκιμασίες ελέγχου της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων (MTT, XTT), προσδιορισμού της ικανότητας λυσοσωμικής πρόσληψης (Neutral Red Uptake), εκτίμησης της επαγωγής οξειδωτικού στρες (χρώση DCFDA), εκτίμησης της ενζυμικής δραστηριότητας (LDH assay), διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών (Trypan Blue), ελέγχου της απόπτωσης (Caspase-3), δοκιμές κυτοκίνης, σημασμένη δοκιμή ιωδιούχου προπιδίου με αννεξίνη-V FITC (Saifi, Khan and Godugu, 2018). Μεταξύ των παραπάνω, η χρήση των αλάτων τετραζολίου, MTT

[3-(4,5-διμεθυλ-2-θειαζολ)-2,5-διφαινυλ-2H-βρωμίδιο του τετραζολίου] και XTT [2,3-δισ(2-μεθοξυ 4-νιτρο-5-σουλφοφαινυλ)-2H-τετραζολίου-5 καρβοξανιλίδιο] είναι η πλέον διαδεδομένη τεχνική για την εκτίμηση της βιωσιμότητας και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Berridge, Herst and Tan, 2005; Tsukatani *et al.*, 2009; Hansen and Bross, 2010; Wang *et al.*, 2010). Αναλυτικότερα, η βιωσιμότητα και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός βασίζονται στην ικανότητα των μιτοχονδριακών ενζύμων, που βρίσκονται στα βιώσιμα κύτταρα, να ανάγουν το MTT σε ένα αδιάλυτο, μοβ προϊόν φορμαζάνης (Abe and Matsuki, 2000) ή το XTT σε ένα υδατοδιαλυτό, πορτοκαλί προϊόν φορμαζάνης (Roehm *et al.*, 1991). Η ποσότητα του προϊόντος της φορμαζάνης μετριέται χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο για την εκτίμηση της σχετικής βιωσιμότητας των κυττάρων (Zhu *et al.*, 2004).

Εκτός όμως από αυτές τις συμβατικές μελέτες τοξικότητας *in vitro* έχουν αρχίσει να κάνουν την εμφάνισή τους τα τρισδιάστατα *in vitro* οργανοειδή μοντέλα για την αξιολόγηση της τοξικότητας των νανοϋλικών (Astashkina *et al.*, 2014), με χαρακτηριστικό παράδειγμα το Epiderm, το οποίο είναι ένα τρισδιάστατο *in vitro* δέρμα και έχει βρει εφαρμογή σε μελέτες γενοτοξικότητας, που προκαλούν τα νανοσωματίδια πυριτίου (Wills *et al.*, 2016).

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι προαναφερόμενες τεχνικές παρέχουν λίγες πληροφορίες σχετικά με τον μηχανισμό ή την αιτία της κυτταρικής τοξικότητας και θανάτου. Όσον αφορά τις μελέτες εκτίμησης της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων, όπως στις μεθόδους των αλάτων τετραζολίου, μετράται η βιωσιμότητα των κυττάρων ως συνάρτηση της μεταβολικής δραστηριότητας, αλλά δεν μπορεί να προσδιοριστεί ο μηχανισμός πρόκλησης της μιτοχονδριακής αδράνειας και του κυτταρικού θανάτου. Στην πραγματικότητα, τυχόν θανατηφόρες συνέπειες από την έκθεση σε νανοσωματίδια, συμπεριλαμβανόμενης της λύσης της μεμβράνης, της διακοπής του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης είναι πιθανόν να επηρεάσουν και να σταματήσουν την μεταβολική δραστηριότητα. Επίσης, οι χρωματογραφικές μέθοδοι στοχεύουν στη διάκριση ζωντανών από νεκρά κύτταρα, επομένως εκλείπουν πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς του κυτταρικού θανάτου (Sharifi *et al.*, 2012).

Η ακρίβεια των χρωματογραφικών τεχνικών για την εκτίμηση της τοξικότητας των νανοϋλικών *in vitro* επηρεάζεται από αλληλεπιδράσεις των νανοσωματιδίων με τις

χρωστικές αυτών των τεχνικών, όπως είναι η χρωστική Neutral Red ή οι μη υδατοδιαλυτοί κρύσταλλοι φορμαζάνης στο MTT. Παράλληλα, παράμετροι όπως η δόση, ο χρόνος έκθεσης των κυττάρων και τα ιδιαίτερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των νανοϋλικών είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε ψευδή αποτελέσματα (Sharifi *et al.*, 2012). Επιπλέον, στα *in vitro* πειράματα χρησιμοποιούνται συνήθως υψηλότερες δόσεις, με αποτέλεσμα η τοξικότητα να είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τα *in vivo* πειράματα, όπου χρησιμοποιούνται πιο χαμηλές δόσεις. Συνεπώς, τα αποτελέσματα από τις σύντομης χρονικής διάρκειας *in vitro* δοκιμασίες δεν μπορούν να αξιοποιηθούν ως ένα καλό προγνωστικό εργαλείο και να προσομοιάσουν επαρκώς τις μακροπρόθεσμες φυσιολογικές επιδράσεις. Έτσι τα *in vitro* συστήματα είναι κυρίως χρήσιμα για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων χαρακτηριστικών των νανοϋλικών, που μπορούν να αξιοποιηθούν ως δείκτες τοξικότητας, προκειμένου να καθοριστεί μια κατάταξη τοξικότητας τους, η οποία θα χρησιμοποιηθεί μετέπειτα σε μηχανιστικές μελέτες (Sayes, Reed and Warheit, 2007).

Η αλληλεπίδραση των νανοϋλικών με πρωτεΐνες και κύτταρα και η πιθανή τοξική επίδραση σε αυτά αποτελούν ένα βασικό κομμάτι στην αξιολόγηση και κατανόηση της βιοσυμβατότητάς τους. Οι αλληλεπιδράσεις νανοϋλικών-κυττάρου περιλαμβάνουν την κυτταρική τους πρόσληψη και την επεξεργασία τους σε διάφορες οδούς, την πρόκληση διαταραχών στην κυτταρική μεμβράνη, τις επιδράσεις στην κυτταρική σηματοδότηση, την επίδραση στους κυτταρικούς καταρράκτες μεταφοράς ηλεκτρονίων, την παραγωγή κυτοκινών, χημειοκινών και ROS, την ενδοκυτταρική μεταφορά, τη ρύθμιση γονιδίων, την εμφανή και μη εμφανή τοξική δραστηριότητα και τέλος την κυτταρική νέκρωση ή απόπτωση. Τις περισσότερες φορές για τις δοκιμές *in vitro* χρησιμοποιούνται κυτταρικές σειρές, είτε εμπορικές είτε γενετικά τροποποιημένες ή ακόμα και πρωτογενή κύτταρα, τα οποία συλλέγονται άμεσα από τον ιστό ενδιαφέροντος προκειμένου να αξιολογηθεί το προφίλ της αντιδραστικότητας των κυττάρων και κατ' επέκταση η πιθανή τοξική δράση του υπό μελέτη νανοσωματιδίου. Για το σκοπό αυτό αξιοποιούνται οι εξής τύποι κυττάρων: φαγοκύτταρα, νευρικά, ηπατικά, επιθηλιακά, ενδοθηλιακά, ερυθροκύτταρα και καρκινικές κυτταρικές σειρές (Jones and Grainger, 2009). Η τοξικότητα των νανοϋλικών έχει συσχετιστεί με το γεγονός ότι αυτά προσλαμβάνονται από τα κύτταρα, γι' αυτό το λόγο πολλές πρώιμες αποκρίσεις πρόσληψης των ξένων αυτών υλικών από τα κύτταρα από διαφορετικές οδούς έκθεσης περιλαμβάνουν

λευκοκύτταρα και φαγοκύτταρα ως πειραματικά μοντέλα εξαιτίας της ικανότητά τους να προσλαμβάνουν ενεργά ξένα υλικά και να αποκρίνονται μέσω αυξημένης παραγωγής ROS (Prahalad *et al.*, 1999; Long *et al.*, 2007). Για τη μελέτη πιθανής τοξικότητας των νανοϋλικών στα ηπατικά κύτταρα χρησιμοποιούνται οι κυτταρικές σειρές HepG2 (Lemaire *et al.*, 2007) και BRL3A (Hussain *et al.*, 2005). Η πιθανή κυτταροτοξικότητα των νανοϋλικών σε αυτού του είδους τα κύτταρα εκδηλώνεται όταν αυτά έρχονται σε επαφή με κύτταρα, που φιλτράρουν το αίμα στα ήπαρ και το μονοκυτταρικό σύστημα φαγοκυττάρων μέσω της εισόδου τους στη ροή του αίματος. Άλλοι τύποι κυττάρων που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της τοξικότητας των νανοϋλικών περιλαμβάνουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα (BAECs και HUVECs), τα ερυθροκύτταρα, τα αιμοπετάλια και τα λευκοκύτταρα (Popielarski *et al.*, 2005). Παράλληλα, στις *in vitro* μελέτες αξιοποιούνται και τα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Αν και αυτοί οι δύο τύποι κυττάρων παρουσιάζουν φαινοτυπικές διαφορές, μοιράζονται ένα κοινό χαρακτηριστικό, το οποίο είναι οι κοινές φυσιολογικές ιδιότητες φραγμού στη μεταφορά ξένων υλικών στο σώμα μέσω του δέρματος, των βλεννογόνων, του πεπτικού συστήματος ή των αγγειακών τοιχωμάτων. Συνεπώς υπάρχει μία μεγάλη επιφάνεια κυττάρων, η οποία εκτίθεται σε νανοϋλικά είτε μέσω του περιβάλλοντος είτε μέσω θεραπευτικών παρεμβάσεων (Lehr, 2002). Τέλος, από τα *in vitro* πειράματα δε θα μπορούσαν να λείπουν οι καρκινικές κυτταρικές σειρές, λόγω του γεγονότος ότι αναπτύσσονται γρήγορα, διαθέτουν υψηλή ικανότητα πρόσληψης σωματιδίων, υπάρχει μεγάλη εμπορική διαθεσιμότητα, ενώ προβλέπουν και φαρμακολογικά τελικά σημεία συγκεκριμένων τύπων όγκου, που προέρχονται από ιστούς σε φάση θεραπείας του καρκίνου, η οποία βασίζεται στη νανοτεχνολογία (Takeuchi, Nakajima and Morimoto, 1999).

3.1 Επιδράσεις των νανοϋλικών σε *in vitro* δοκιμές

3.1.1 Επιδράσεις στην κυτταρική βιωσιμότητα και θνησιμότητα

Η βιωσιμότητα των κυττάρων και η θνησιμότητα είναι οι δύο παράμετροι που μελετώνται για την εκτίμηση της τοξικότητας που προκαλείται από τα νανოსωματίδια. Μεταξύ των διαφόρων νανοςωματιδίων, οι νανοςωλήνες άνθρακα (Carbon nanotubes, CNTs) χρησιμοποιούνται συχνότερα για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας και της θνησιμότητας των κυττάρων, καθότι βρίσκουν ευρεία χρήση σε χημικές, βιομηχανικές και βιοϊατρικές εφαρμογές λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων

τους (Guo *et al.*, 2012; Sathyanarayana and Hübner, 2013). Ειδικότερα, συντίθενται ως νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος (SWCNTs) και νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWCNTs) (Madani, Mandel and Seifalian, 2013). Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των CNTs έχουν παρατηρηθεί από μελέτες σε διάφορα βακτήρια και οφείλονται στη μηχανική βλάβη που προκαλείται από τους νανοσωλήνες (Amarnath *et al.*, 2012; Pasquini *et al.*, 2012). Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι οι νανοσωλήνες άνθρακα που έχουν υποστεί λειτουργικοποίηση επηρεάζουν την ποικιλομορφία του εδάφους (Kerfahi *et al.*, 2015). Επίσης, νανοσωματίδια που συντέθηκαν από οξειδίο του σιδήρου έχουν αναφερθεί ως τοξικά σε κύτταρα μακροφάγων ποντικού, ανθρώπινα μακροφάγα, ανθρώπινα καρκινικά ηπατοκύτταρα και μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα αρουραίου. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου οδήγησαν σε μείωση της βιωσιμότητας των προαναφερθέντων κυττάρων (Naqvi *et al.*, 2010). Μια άλλη μελέτη τοξικότητας που πραγματοποιήθηκε σε βλαστικά μεσεγχυματικά κύτταρα αρουραίων ανέφερε μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων έπειτα από την έκθεση σε νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου (Delcroix *et al.*, 2009). Επιπροσθέτως, τα νανοσωματίδια του πυριτίου έχουν υποδειχθεί ως τοξικά στα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, σε μια μελέτη, η τοξικότητα των νανοσωματιδίων πυριτίου αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα HaCaT. Τα αποτελέσματα της μελέτης υπέδειξαν τη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων μετά από την έκθεση στα νανοσωματίδια (Park *et al.*, 2010).

3.1.2 Επιδράσεις στις κυτταρικές σειρές

Η τοξικότητα μίας μεγάλης ποικιλίας νανοσωματιδίων έχει αξιολογηθεί σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Ξεκινώντας με τους νανοσωλήνες άνθρακα, η επίδραση των νανοσωλήνων άνθρακα μονού τοιχώματος έχει διερευνηθεί από διάφορους ερευνητές σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένων των εμβρυικών νεφρικών κυττάρων HEK 293, των κυττάρων αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα A549, των μακροφάγων και των επιθηλιακών κυττάρων καρκίνου των ωοθηκών HeLa (Fiorito *et al.*, 2006; Davoren *et al.*, 2007; Yehia *et al.*, 2007). Ειδικότερα, η έκθεση κυττάρων A549 σε SWCNTs προκάλεσε οξειδωτική απόκριση και βλάβη της μεμβράνης, που προκλήθηκε από φλεγμονώδη απόκριση (Choi, Oh and Choy, 2009). Επίσης, πολυάριθμες *in vitro* μελέτες έχουν αναφέρει διάφορες τοξικολογικές επιδράσεις των

MWCNTs, όπως η επαγωγή οξειδωτικού στρες, η πρόκληση βλάβης στο DNA και η επαγωγή απόπτωσης σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών (Ravichandran *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2009; Cveticanin *et al.*, 2010; Patlolla, Patlolla and Tchounwou, 2010; Reddy *et al.*, 2010). Υπό αυτό το πρίσμα, οι επιδράσεις των νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων έχουν αξιολογηθεί στα ανθρώπινα επιδερμικά κερατινοκύτταρα (Monteiro-Riviere *et al.*, 2005). Σε αυτό το πλαίσιο, προτάθηκε ότι η τοξικότητα που προκαλείται από τους νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων οφείλεται σε προφλεγμονώδεις επιδράσεις οι οποίες διαμεσολαβούνται κυρίως από την παραγωγή ROS (Chen *et al.*, 2018).

Στη συνέχεια παρατίθενται αποτελέσματα μελέτων στις οποίες εξετάστηκε η επίδραση νανοσωματιδίων μετάλλων σε κυτταρικές σειρές. Αρχικά, η ερευνητική ομάδα των Li *et al.* (2010) διερεύνησε την επίδραση των νανοσωματιδίων χρυσού (AuNPs) σε ανθρώπινους ινοβλάστες πνευμόνων MRC-5 διαπιστώνοντας την επαγωγή οξειδωτικού στρες. Επίσης, έχει μελετηθεί η τοξικότητα των νανοσωματιδίων αργύρου με επικάλυψη αμύλου σε ανθρώπινα κύτταρα γλοιοβλαστώματος U251 και σε ανθρώπινα κύτταρα ινοβλαστών πνευμόνων IMR-90. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης παρατηρήθηκε μία δόσοεξαρτώμενη μείωση του περιεχομένου ATP και βλάβη στο DNA. Η βλάβη του DNA οφειλόταν στην εναπόθεση νανοσωματιδίων αργύρου και στην αλληλεπίδραση αυτών με το DNA ακολουθούμενη από διακοπή του κυτταρικού κύκλου (AshaRani *et al.*, 2009a). Επιπροσθέτως, η μελέτη κυτταροτοξικότητας σε κύτταρα ινοβλαστών NIH3T3 υπέδειξε ότι τα νανοσωματίδια αργύρου προκάλεσαν την επαγωγή απόπτωσης, η οποία σχετίζεται με την αυξημένη παραγωγή ROS (Hsin *et al.*, 2008). Η τοξικότητα των νανοσωματιδίων αργύρου αξιολογήθηκε επίσης στην ανθρώπινη ηπατική καρκινική σειρά HepG2 μέσω δοκιμής μικροπυρήνων, ανάλυσης βιωσιμότητας και ανάλυσης μικροσυστοιχιών DNA (Kawata, Osawa and Okabe, 2009). Ακόμα, μια μελέτη ανέφερε την τοξικότητα των νανοσωματιδίων αργύρου στα κύτταρα HeLa. Η έκθεση των κυττάρων στα νανοσωματίδια είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση των γονιδίων *ho-1* και *mt-2A* και την επαγωγή οξειδωτικού στρες (Miura & Shinohara, 2009). Επιπλέον, η επώαση μικροαγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων ανθρώπινου εγκεφάλου HBMVECs με νανοσωματίδια αλουμινίου για 24 ώρες είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, τη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων και την επαγωγή οξειδωτικού στρες (Chen *et al.*, 2008).

Σε μια άλλη μελέτη, προσδιορίστηκε η βιωσιμότητα μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων που προέρχονται από μυελό των οστών HMSC έπειτα από την αλληλεπίδραση με νανοσωματίδια αργιλίου. Τα αποτελέσματα της μελέτης υπέδειξαν μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας (Alshatwi *et al.*, 2012). Στο ίδιο μήκος κύματος, αλλά σε άλλη μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης νανοσωματιδίων αργιλίου σε κύτταρα αίματος αρουραίου και παρατηρήθηκε μια δόσοεξαρτώμενη τοξικότητα (Balasubramanyam *et al.*, 2009). Τέλος, η επώαση κυτταρικών σειρών θηλαστικών L5178Y και BEAS-2B με νανοσωματίδια αλουμινίου για 2 ώρες οδήγησε σε πρόκληση βλάβης στο κυτταρικό DNA (Kim *et al.*, 2009).

3.1.3 Δόση και LD50

Η τοξικότητα των νανοσωματιδίων καθορίζεται από τις συνθήκες έκθεσης, τη διάρκεια έκθεσης και τη δόση (Pantarotto *et al.*, 2004). Σε μια μελέτη σε αθανатоποιημένα επιδερμικά κερατινοκύτταρα η έκθεση σε SWCNTs σε εύρος συγκεντρώσεων 0,06-0,24 mg / mL για 2, 4, 6 και 8 ώρες οδήγησε σε μειωμένη βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από 4 ώρες, ενώ η έκθεση στην υψηλότερη δόση προκάλεσε μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας στο 65% (Shvedova *et al.*, 2003). Η έκθεση ανθρωπίνων εμβρυϊκών νεφρικών κυττάρων σε SWCNTs (0,7812-200 µg / mL) για 24-120 ώρες επήγαγε κυτταροτοξικότητα, εξαρτώμενη από το χρόνο και τη δόση, με διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 στο 43,5% των κυττάρων μετά τις 24 ώρες (Cui *et al.*, 2005). Από την άλλη, η έκθεση περιτοναϊκών μακροφάγων μυών σε SWCNT σε εύρος συγκεντρώσεων 0-7,3 µg / mL για 4, 8, 12 και 18 ώρες, δεν προκάλεσε τοξικότητα στα κύτταρα που προσέλαβαν τα νανοσωματίδια (Cherukuri *et al.*, 2004). Ωστόσο, η επώαση κυψελιδικών μακροφάγων ινδικού χοιριδίου με SWCNTs σε εύρος συγκεντρώσεων από 0,141-226.00 µg / cm² για 3 ώρες, προκάλεσε κυτταροτοξικότητα στα 0,38 µg / cm² και νέκρωση στα 3,06 µg / cm² (Jia *et al.*, 2005). Επιπροσθέτως η επώαση κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων αρουραίου NR8383 και ανθρώπινων κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων A549 με SWCNTs σε εύρος συγκεντρώσεων από 5–100 µg / mL για 24–96 ώρες προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη κυτταροτοξικότητα και μείωση του αριθμού των κυττάρων κατά 60-80% (Pulskamp, Diabaté and Krug, 2007).

Η τοξικότητα των MWCNTs έχει αξιολογηθεί σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Ειδικότερα, η επώαση κυττάρων *HEK* με MWCNTs σε εύρος συγκεντρώσεων από 0,1-0,4 mg / mL για 1, 4, 8, 12, 24 και 48 ώρες, προκάλεσε μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας στο 73% στην υψηλότερη δόση. Επίσης, η χρήση MWCNTs για την αξιολόγηση της τοξικότητας στους ινοβλάστες ανθρώπινου δέρματος σε εύρος συγκεντρώσεων από 0,06-0,6 mg / mL για 24 και 48 ώρες, οδήγησε σε δοσοεξαρτώμενη τοξικότητα (Ding *et al.*, 2005).

Η έκθεση κύτταρων *HeLa* και *3T3 / NIH* σε νανοσωματίδια χρυσού στα 150 pM για 3 ώρες είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά 20% και 5%, αντίστοιχα (Tkachenko *et al.*, 2004). Σε μια άλλη μελέτη, κύτταρα μακροφάγων εκτέθηκαν σε νανοσωματίδια χρυσού με μέγεθος σωματιδίων 10-100 nm για 24-72 ώρες. Η μελέτη έδειξε ότι τα νανοσωματίδια των 100 nm μείωσαν την κυτταρική βιωσιμότητα στο 85% στις 72 ώρες (Shukla *et al.*, 2005). Σε μια μελέτη σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες εκτιμήθηκε η τοξικότητα νανοσωματιδίων χρυσού σε συγκεντρώσεις από 0-0,8 mg / mL για 2-6 ημέρες. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν δοσοεξαρτώμενη μείωση της κυτταρικής πυκνότητας (Pernodet *et al.*, 2006). Η έκθεση ανθρωπίνων ινοβλαστών με νανοσωματίδια Fe_3O_4 στα 0-1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ για 24 ώρες είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά 25-50% (Gupta and Wells, 2004). Σε μια άλλη μελέτη που διεξήχθη σε μακροφάγα ποντικού, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε νανοσωματίδια Fe_3O_4 στα 0,2 mg / mL για 1 και 4 ημέρες. Η μελέτη έδειξε ότι η κυτταροτοξικότητα εξαρτάται από τη δόση (Hu, Covic and Boys, 2006). Τέλος, η έκθεση ανθρωπίνων κυττάρων καρκίνου του μαστού *SK-BR-3* σε νανοσωματίδια Fe_3O_4 στα 10-400 nM για 48 ώρες, η μελέτη είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της βιωσιμότητας στο 91% (Yu *et al.*, 2006).

3.1.4 Μηχανιστικές μελέτες

Προκειμένου να εκτιμηθούν οι επιδράσεις των νανοσωματιδίων *in vitro* έχει πραγματοποιηθεί μία πληθώρα μηχανιστικών μελετών. Ως εκ τούτου, στην παράγραφο αυτή αναφέρονται ενδεικτικά ορισμένες εξ αυτών. Πιο συγκεκριμένα, *in vitro* μελέτες αποκάλυψαν ότι οι νανοσωληνές άνθρακα διαταράσσουν το δυναμικό και την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς και τη μεταβολική δραστηριότητα (Kim *et al.*, 2010; Clark *et al.*, 2012). Επίσης, τα φουλλερένια, που υπάγονται στην ευρύτερη κατηγορία των νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα,

προκαλούν βλάβη στο DNA και επάγουν το οξειδωτικό στρες σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών (Dhawan *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009). Τα νανοσωματίδια χρυσού είναι υπεύθυνα για την πρόκληση μιτοχονδριακών βλαβών, επηρεάζοντας την κυτταρική μικροκινητικότητα και επάγοντας την αυτοφαγία και το οξειδωτικό στρες (Y. Pan *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010). Τέλος, *in vitro* μελέτες σχετικά με την τοξικότητα των νανοσωματιδίων αργύρου έχουν δείξει ότι επιδρά στην πιστότητα της αντιγραφής του DNA, στην επαγωγή της απόπτωσης, στην πρόκληση οξειδωτικού στρες, στην εκδήλωση κυτταροτοξικότητας, στη χρωμοσωμική αστάθεια, στις ενδοκυτταρικές μεταβολές ασβεστίου και στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα θηλαστικών (Hsin *et al.*, 2008; AshaRani *et al.*, 2009a; Kawata, Osawa and Okabe, 2009; Miura and Shinohara, 2009; Foldbjerg, Dang and Autrup, 2011).

4. In vivo δοκιμές

4.1 Μέθοδοι εκτίμησης τοξικότητας in vivo

Οι *in vivo* μελέτες αποτελούν σημαντική προϋπόθεση για τη διερεύνηση των βιολογικών επιπτώσεων των νανοϋλικών, εξαιτίας του γεγονότος ότι τα *in vivo* συστήματα περιλαμβάνουν μοναδικούς μηχανισμούς κατανομής, μεταβολισμού, απέκκρισης και ανοσοαποκρίσεων (Vardakas *et al.*, 2021). Οι άνθρωποι εκτίθενται καθημερινά σε μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών ρύπων, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται και τα νανοϋλικά (Tsiaoussis *et al.*, 2019). Γι' αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί στρατηγικές, που αξιολογούν την επίδραση χαμηλών δόσεων μιγμάτων ξενοβιοτικών, για μεγάλες χρονικές περιόδους, προσομοιώνοντας τις συνθήκες έκθεσης στην πραγματική ζωή (Tsatsakis, Docea and Tsitsimpikou, 2016; Tsatsakis *et al.*, 2017). Λαμβάνοντας αυτό υπόψη είναι μεγάλης σημασίας η αξιολόγηση της οξείας και χρόνιας έκθεσης στα νανουλικά σε χαμηλές δόσεις, προκειμένου να προσδιοριστούν οι επιπτώσεις τους στην ανθρώπινη υγεία (Vardakas *et al.*, 2021).

Η *in vivo* εκτίμηση τοξικότητας πραγματοποιείται σε διάφορα ζωικά μοντέλα με κυριότερα τα τρωκτικά, όπως μύες και επίμυες, μιας και εμφανίζουν πολλά κοινά με τους ανθρώπους, ως προς την ανατομία, τη φυσιολογία και το γενετικό υπόβαθρο (Bryda, 2013). Οι μέθοδοι αξιολόγησης της *in vivo* τοξικότητας περιλαμβάνουν την εκτίμηση της βιολογικής κατανομής, την κάθαρση, την αιματολογία, τη χημεία του ορού και την ιστοπαθολογία. Μελέτες βιοκατανομής εξετάζουν τη διαδρομή εναπόθεσης των νανοσωματιδίων στον ιστό ή το όργανο. Τα νανοσωματίδια

ανιχνεύονται στα νεκρά ή ζωντανά ζώα μέσω ραδιοσήμανσης (Kim *et al.*, 2001). Ο έλεγχος της κάθαρσης των νανοσωματιδίων πραγματοποιείται με την εξέταση της απέκκρισης και του μεταβολισμού των νανοσωματιδίων σε διάφορα χρονικά σημεία μετά την έκθεση (Li *et al.*, 2001). Μια άλλη μέθοδος για την *in vivo* εκτίμηση της τοξικότητας είναι η εξέταση των αλλαγών στη χημεία του ορού και στον τύπο των κυττάρων μετά από την έκθεση σε νανοσωματίδια (Baker *et al.*, 2008). Η ιστοπαθολογία του κυττάρου, του ιστού ή του οργάνου μετά την έκθεση χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του επιπέδου τοξικότητας, που προκαλείται από ένα νανοσωματίδιο (Lei *et al.*, 2008). Η ιστοπαθολογική εξέταση έχει χρησιμοποιηθεί για ποικίλους ιστούς, που εκτίθενται σε νανοσωματίδια όπως τους πνεύμονες, τα μάτια, τον εγκέφαλο, το ήπαρ, τα νεφρά, την καρδιά και το σπλήνα (Baker *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008). Τα πειραματόζωα μπορούν να εκτεθούν στα υπό μελέτη νανοϋλικά, μέσω διαφορετικών οδών έκθεσης (εισπνοή, κατάποση, δέρμα) και για διαφορετικούς χρόνους. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα της έκθεσης μπορούν να αξιολογηθούν με βάση βιοδείκτες εκτίμησης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Πιο συγκεκριμένα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο βασικές κατηγορίες μεταφραστικών βιοδεικτών, βιοδείκτες αντιοξειδωτικής ικανότητας και οξειδωτικής καταστροφής, που προδιορίζονται φασματοφωτομετρικά για την αξιολόγηση της κατάστασης οξειδοαναγωγής (Vardakas *et al.*, 2021).

4.2 Επίδρασεις σε συστήματα *in vivo*

Η επίδραση των νανοσωματιδίων σε μοντέλα *in vivo* φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με την οδό έκθεσης. Διάφορες ερευνητικές ομάδες διαπίστωσαν ότι η έκθεση σε νανοσωματίδια μέσω του αναπνευστικού συστήματος θα μπορούσε να οδηγήσει σε άσθμα, βρογχίτιδα, εμφύσημα και καρκίνο του πνεύμονα. Η είσοδος νανοσωματιδίων μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα θα μπορούσε να οδηγήσει σε νόσο του Crohn και καρκίνο του παχέος εντέρου. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η έκθεση σε νανοσωματίδια μέσω του κυκλοφορικού συστήματος μπορεί να οδηγήσει σε πήξη του αίματος και καρδιακές παθήσεις (Buzea, Pacheco and Robbie, 2007; Madani, Mandel and Seifalian, 2013).

Η *in vivo* τοξικότητα των νανοσωλήνων άνθρακα έχει αξιολογηθεί με τη χρήση οργανισμών-μοντέλων, όπως τα ινδικά χοιρίδια, οι μύες και οι επίμυες. Η επίδραση των νανοσωλήνων άνθρακα μονού τοιχώματος εξετάστηκε σε μύες και επίμυες από

διάφορους ερευνητές, διαπιστώνοντας τραυματισμό των κυττάρων και παροδικές φλεγμονώδεις αντιδράσεις (Lam *et al.*, 2004, 2006; Shvedova *et al.*, 2005). Μια άλλη μελέτη ανέφερε εισροή λεμφοκυττάρων και μακροφάγων, πρόωμη συσσώρευση ουδετερόφιλων, αύξηση των προφλεγμονωδών κυτοκινών και του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού ινωδογόνου (Shvedova *et al.*, 2005). Η επίδραση των MWCNTs μελετήθηκε επίσης σε επίμυες και αξιολογήθηκε η επαγόμενη φλεγμονή και η βλάβη στους πνεύμονες (Muller *et al.*, 2005). Οι MWCNTs είναι επίσης γνωστοί για την πρόκληση χρωμοσωμικών εκτροπών, αλλεργικών αποκρίσεων, την ενεργοποίηση ενζύμων κυκλοοξυγενάσης, μέσω καταστολής της συστημικής ανοσολογικής λειτουργίας στο σπλήνα και τη διαφοροποίηση της γονιδιακής έκφρασης στο ήπαρ (Ji *et al.*, 2009; Mitchell *et al.*, 2009; Nygaard *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2010; Patlolla, Patlolla and Tchounwou, 2010). Άλλες επιδράσεις των MWCNTs περιλαμβάνουν την απόπτωση, τα φαινοτυπικά ελαττώματα, την τοξικότητα στα βακτήρια και την πρόκληση ανωμαλιών στο νωτιαίο μυελό (Kang, Mauter and Elimelech, 2008; AshaRani *et al.*, 2009b; Cheng *et al.*, 2009).

In vivo έκθεση ποντικών σε νανοσωματίδια χρυσού οδήγησε σε απόπτωση και οξεία φλεγμονή στο ήπαρ, βιοσυσσώρευση στα όργανα και ικανότητα διείσδυσης στις περιοχές της κεφαλής και της ουράς του σπέρματος (Cho *et al.*, 2009; Wiwanitkit, Sereemasapun and Rojanathanes, 2009; Lasagna-Reeves *et al.*, 2010). In vivo μελέτες έχουν αναφέρει ότι η έκθεση σε νανοσωματίδια αργύρου προκαλεί οίδημα των αστροκυττάρων, καταστροφή του αιματεγκεφαλικού φραγμού, οξειδωτικό στρες, που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες, αλλοίωση της γονιδιακής έκφρασης και νευρωνικό εκφυλισμό (Rahman *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2009; Paul and Sharma, 2010). Η κατανομή και η συσσώρευση νανοσωματιδίων αργύρου διερευνήθηκε σε επίμυες μετά από υποδόρια ένεση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα νανοσωματίδια κατανεμήθηκαν στο ήπαρ, το σπλήνα, το νεφρό, τον εγκέφαλο και τους πνεύμονες (Tang *et al.*, 2009). Η ικανότητα σχηματισμού οιδήματος και διαπερατότητας στον αιματεγκεφαλικό φραγμό διερευνήθηκε σε επίμυες με ενδοπεριτοναϊκή, ενδοεγκεφαλική και ενδοφλέβια χορήγηση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα νανοσωματίδια οδήγησαν σε σχηματισμό οιδήματος στον εγκέφαλο επηρεάζοντας τον αιματεγκεφαλικό φραγμό (Paul and Sharma, 2010). Επίσης, μια μελέτη χρησιμοποίησε νανοσωματίδια αργύρου για να αξιολογήσει τις επιδράσεις τους στη γονιδιακή έκφραση σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου μυών. Η μελέτη υπέδειξε

ότι τα νανοσωματίδια αργύρου προκαλούν νευροτοξικότητα μέσω της δημιουργίας ελεύθερων ριζών (Rahman *et al.*, 2009). Προηγούμενες μελέτες ανέφεραν πνευμονική τοξικότητα μετά από ενδοτραχειακή χορήγηση νανοσωματιδίων πυριτίου σε αρσενικά A/J ποντίκια. Τα αποτελέσματα της μελέτης υπέδειξαν την πρόκληση οξείας πνευμονικής φλεγμονής και τη διείσδυση ουδετερόφιλων στους πνευμονικούς ιστούς με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Cho *et al.*, 2007). Τέλος, μελέτες που διεξήχθησαν σε πνευμονικούς ιστούς έδειξαν μετατόπιση και διάχυση νανοσωματιδίων πυριτίου μακριά από τον πνευμονικό ιστό μέσω της συστημικής κυκλοφορίας και εναπόθεση αυτών σε άλλα όργανα (Oberdörster *et al.*, 2002, 2004; Chen *et al.*, 2004).

4.2.1 Μηχανιστικές μελέτες

In vivo μηχανιστικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την εκτίμηση της τοξικότητας που προκαλείται από τα νανοσωματίδια. Τα νανοσωματίδια αργύρου είναι γνωστά για τη γενετοξικότητα και την κυτταροτοξικότητα που επάγουν στους ιχθύες, για τις δυσμενείς επιπτώσεις που επιφέρουν στην ανάπτυξη εμβρύων στρειδιών, αλλά και την επαγωγή οξειδωτικού στρες και την έκφραση της πρωτεΐνης p53 στο zebrafish (Bar-Ilan *et al.*, 2009; Choi, Oh and Choy, 2009; Ringwood *et al.*, 2010; Wise *et al.*, 2010). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο zebrafish, παρατηρήθηκε ότι τα νανοσωματίδια αργύρου προκάλεσαν επαγωγή απόπτωσης και οξειδωτικό στρες στο ήπαρ (Choi *et al.*, 2010). Μια άλλη μελέτη κατέδειξε τη γενετοξικότητα και την κυτταροτοξικότητα των νανοσωματιδίων αργύρου σε κύτταρα ψαριών. Τα αποτελέσματα έδειξαν επαγόμενη ανευπλοειδία και χρωμοσωμικές εκτροπές μετά την έκθεση στα νανοσωματίδια (Wise *et al.*, 2010). Στη *Drosophila melanogaster* τα νανοσωματίδια αργύρου προκαλούν οξειδωτικό στρες, θερμικό σοκ και υπερέκφραση των p53 πρωτεϊνών (Ahamed *et al.*, 2010). Στο *Caenorhabditis elegans* τα νανοσωματίδια αργύρου προκαλούν οξειδωτικό στρες και μείωση του δυναμικού αναπαραγωγής (Roh *et al.*, 2009).

Η τοξικότητα των νανοσωματιδίων ψευδάργυρου έχει εκτιμηθεί στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκινώματος του τραχήλου της μήτρας *HEp-2*, στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά *HEK 293*, καθώς και στα ανθρώπινα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα. Τα νανοσωματίδια ψευδάργυρου (10-100 $\mu\text{g} / \text{mL}$) επώαστηκαν για 24-48 ώρες με κύτταρα *HEp-2*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα νανοσωματίδια οξειδίου του ψευδαργύρου ήταν τοξικά για τα κύτταρα προκαλώντας βλάβη στο DNA και μείωση

της βιωσιμότητας των κυττάρων (Osman *et al.*, 2010). Όταν η κυτταρική σειρά *HEK 293* υποβλήθηκε σε επεξεργασία με νανοσωματίδια οξειδίου του ψευδαργύρου για 24 ώρες παρατηρήθηκε μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν επίσης βλάβη στο DNA, επαγωγή οξειδωτικού στρες και μιτοχονδριακή βλάβη (Guan *et al.*, 2012). Ομοίως, όταν τα ανθρώπινα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με οξείδιο του ψευδαργύρου (100 μg / mL) παρατηρήθηκε απελευθέρωση της LDH, μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας και επαγωγή οξειδωτικού στρες (Huang *et al.*, 2010). Η τοξικότητα των νανοσωματιδίων τιτανίου επηρεάζει τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την απόπτωση και την κινητικότητα (Kiss *et al.*, 2008; Z. Pan *et al.*, 2009). Η τοξικότητα των νανοσωματιδίων οξειδίου του τιτανίου παρατηρήθηκε χρησιμοποιώντας κερατινοκύτταρα *HaCaT*, ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες και ανθρώπινες αθανатоποιημένες κυτταρικές σειρές σμηγματογόνου αδένων SZ95. Η κυτταροτοξικότητα επηρέασε τις κυτταρικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένης της διαφοροποίησης, του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της κινητικότητας, που οδήγησε σε απόπτωση (Kiss *et al.*, 2008).

5. Συμπεράσματα

Στη σύγχρονη εποχή, η χρήση των νανοϋλικών έχει επεκταθεί σημαντικά σε ποικίλους τομείς της καθημερινότητας, χωρίς ωστόσο να έχουν επιλυθεί πλήρως ζητήματα που αφορούν την ανθρώπινη ασφάλεια. Η τοξικότητα των νανοϋλικών επηρεάζεται σημαντικά από τα μοναδικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους και πιο συγκεκριμένα το μέγεθος, τη μορφολογία, το φορτίο και την επικάλυψη επιφανείας, τη διαλυτότητα και την κρυσταλλική δομή τους. Ως εκ τούτου, ο χαρακτηρισμός αυτών, με τη χρήση συγκεκριμένων τεχνικών μικροσκοπίας, μπορεί να παίζει καθοριστικό ρόλο στην εκτίμηση των τοξικών τους επιδράσεων. Παρότι η τοξικότητά τους συσχετίζεται κυρίως με μηχανισμούς που προκαλούν την υπέρμετρη παραγωγή ROS και επάγουν το οξειδωτικό στρες, στην πραγματικότητα φαίνεται να εμπλέκεται μία πληθώρα μηχανισμών και εν τέλει η τοξικότητα τους πιστεύεται ότι είναι συνέπεια ενός συνδυασμού αυτών.

Τα είδη τοξικότητας, που επάγονται από τα νανοϋλικά περιλαμβάνουν κυρίως την κυτταροτοξικότητα, την γενotoξικότητα και την οικοτοξικότητα. Αν και υπάρχουν

αρκετά παραδείγματα τοξικών τους επιδράσεων, το οξειδωτικό στρες φαίνεται να αποτελεί τη σημαντικότερο εξ αυτών. Πολλές μελέτες έχουν αξιολογήσει τη συγκεκριμένη επίδραση, με δοκιμές *in vitro* και *in vivo*. Μιας και τα νανοϋλικά, όπως και η νανοτεχνολογία, παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία εφαρμογών σε διάφορα προϊόντα καθημερινής χρήσης, καταναλωτές και εργαζόμενοι είναι απαραίτητο να προστατεύονται από τις δυσμενείς τους επιδράσεις. Όσον αφορά την εκτίμηση ενός πιθανού περιβαλλοντικού ή υγειονομικού κινδύνου από τα νανοϋλικά, η γνώση της σύνθεσης του προϊόντος κρίνεται απαραίτητη.

Παρά την ανάγκη αναγνώρισης των πιθανών κινδύνων, που ελοχεύουν από την μακροπρόθεσμη έκθεση στα νανοϋλικά, αλλά και την αξιολόγηση της πιθανής τοξικότητας που αυτά επάγουν, τα νανοϋλικά μπορούν να αξιοποιηθούν σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, με σημαντικότερη την εμπλοκή τους στον τομέα της ιατρικής. Ειδικότερα, τα νανοϋλικά αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο στη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου, με πολλούς επιστήμονες να στρέφουν το ενδιαφέρον τους σε αυτά, καθότι ο καρκίνος ως σύνθετο, πολυπαραγοντικό νόσημα απαιτεί προσωποποιημένη θεραπεία. Σε αυτό το πλαίσιο, τα νανοϋλικά μπορούν να αξιοποιηθούν στο κομμάτι της στοχευμένης χορήγησης φαρμάκων, ως φορείς, εφόσον φυσικά εμφανίζουν υψηλό βαθμό βιοσυμβατότητας με τα υγιή κύτταρα. Συνοψίζοντας, γίνεται σαφές πως είναι επιτακτική η ανάγκη για διεξαγωγή περαιτέρω μελετών εκτίμησης του κινδύνου των νανοϋλικών, τόσο για την προστασία της ανθρώπινης υγείας και του περιβάλλοντος, όσο και για τη μελλοντική αξιοποίησή τους σε τομείς, που πρόκειται να βελτιώσουν σημαντικά την ποιότητα ζωής.

Βιβλιογραφία

- Abe, K. and Matsuki, N. (2000) 'Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT', *Neuroscience Research*, 38(4), pp. 325–329. doi: 10.1016/S0168-0102(00)00188-7.
- Abou El-Nour, K. M. M. *et al.* (2010) 'Synthesis and applications of silver nanoparticles', *Arabian Journal of Chemistry*. Elsevier, pp. 135–140. doi: 10.1016/j.arabjc.2010.04.008.
- Ahamed, M. *et al.* (2010) 'Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242(3), pp. 263–269. doi: 10.1016/j.taap.2009.10.016.
- Alshatwi, A. A. *et al.* (2012) 'Al₂O₃ Nanoparticles Induce Mitochondria-Mediated Cell Death and Upregulate the Expression of Signaling Genes in Human Mesenchymal Stem Cells', *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 26(11), pp. 469–476. doi: 10.1002/jbt.21448.
- Amarnath, S. *et al.* (2012) 'β-Galactosidase Leakage from *Escherichia coli* Points to Mechanical Damages Likely Cause of Carbon Nanotube Toxicity', *Soft Nanoscience Letters*, 2, pp. 41–45. doi: 10.4236/snl.2012.23008.
- AshaRani, P. V. *et al.* (2009a) 'Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells', *ACS Nano*, 3(2), pp. 279–290. doi: 10.1021/nn800596w.
- AshaRani, P. V. *et al.* (2009b) 'Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells', *ACS Nano*, 3(2), pp. 279–290. doi: 10.1021/nn800596w.
- Astashkina, A. I. *et al.* (2014) 'Nanoparticle toxicity assessment using an invitro 3-D kidney organoid culture model', *Biomaterials*, 35(24), pp. 6323–6331. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.060.
- Avramescu, M. L. *et al.* (2017) 'Influence of pH, particle size and crystal form on dissolution behaviour of engineered nanomaterials', *Environmental Science and Pollution Research*, 24(2), pp. 1553–1564. doi: 10.1007/s11356-016-7932-2.
- Baker, G. L. *et al.* (2008) 'Inhalation Toxicity and Lung Toxicokinetics of C60

Fullerene Nanoparticles and Microparticles’, *Toxicological Sciences*, 101(1), pp. 122–131. doi: 10.1093/toxsci/kfm243.

Balasubramanyam, A. *et al.* (2009) ‘In vivo genotoxicity assessment of aluminium oxide nanomaterials in rat peripheral blood cells using the comet assay and micronucleus test’, *Mutagenesis*, 24(3), pp. 245–251. doi: 10.1093/mutage/geb003.

Bar-Ilan, O. *et al.* (2009) ‘Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos’, *Small*, 5(16), pp. 1897–1910. doi: 10.1002/smll.200801716.

Barrena, R. *et al.* (2009) ‘Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles’, *Chemosphere*, 75(7), pp. 850–857. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.01.078.

Bartek, J., Mistrik, M. and Bartkova, J. (2010) ‘Long-distance inflammatory and genotoxic impact of cancer in vivo’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, pp. 17861–17862. doi: 10.1073/pnas.1013093107.

Berridge, M. V., Herst, P. M. and Tan, A. S. (2005) ‘Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction’, *Biotechnology Annual Review*. Biotechnol Annu Rev, pp. 127–152. doi: 10.1016/S1387-2656(05)11004-7.

Betters, J. L. *et al.* (2004) ‘Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis’, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 170(11), pp. 1179–1184. doi: 10.1164/rccm.200407-939OC.

Bhatia, S. (2016) ‘Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications’, in *Natural Polymer Drug Delivery Systems*. Springer International Publishing, pp. 33–93. doi: 10.1007/978-3-319-41129-3_2.

Braydich-Stolle, L. K. *et al.* (2009) ‘Crystal structure mediates mode of cell death in TiO₂ nanotoxicity’, *Journal of Nanoparticle Research*, 11(6), pp. 1361–1374. doi: 10.1007/s11051-008-9523-8.

Bryda, E. C. (2013) ‘The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research.’, *Missouri medicine*, 110(3), pp. 207–211.

- Buzea, C., Pacheco, I. I. and Robbie, K. (2007) 'Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity', *Biointerphases*, 2(4), pp. MR17–MR71. doi: 10.1116/1.2815690.
- Chaurasia, N. (2017) 'Nanotechnology and Nanomaterials in Everyday Life', *International Journal of Science and Research*, 6(4), pp. 1560–1562.
- Chen, L. *et al.* (2008) 'Manufactured aluminum oxide nanoparticles decrease expression of tight junction proteins in brain vasculature', *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 3(4), pp. 286–295. doi: 10.1007/s11481-008-9131-5.
- Chen, Y. *et al.* (2004) 'Comparing study of the effect of nanosized silicon dioxide and micro-sized silicon dioxide on fibrogenesis in rats', *Toxicology and Industrial Health*, 20(5), pp. 21–27. doi: 10.1191/0748233704th190oa.
- Chen, Y. *et al.* (2018) 'Two-Dimensional Metal Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications', *Chemical Reviews*. American Chemical Society, pp. 6409–6455. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00727.
- Cheng, J. *et al.* (2009) 'Acute and long-term effects after single loading of functionalized multi-walled carbon nanotubes into zebrafish (*Danio rerio*)', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 235(2), pp. 216–225. doi: 10.1016/j.taap.2008.12.006.
- Cherukuri, P. *et al.* (2004) 'Near-infrared fluorescence microscopy of single-walled carbon nanotubes in phagocytic cells', *Journal of the American Chemical Society*, 126(48), pp. 15638–15639. doi: 10.1021/ja0466311.
- Cho, S. J. *et al.* (2007) 'Long-term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells', *Langmuir*, 23(4), pp. 1974–1980. doi: 10.1021/la060093j.
- Cho, W. S. *et al.* (2009) 'Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236(1), pp. 16–24. doi: 10.1016/j.taap.2008.12.023.
- Choi, A. O. *et al.* (2007) 'Quantum dot-induced cell death involves Fas upregulation and lipid peroxidation in human neuroblastoma cells', *Journal of Nanobiotechnology*, 5. doi: 10.1186/1477-3155-5-1.

- Choi, J. E. *et al.* (2010) 'Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish', *Aquatic Toxicology*, 100(2), pp. 151–159. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.12.012.
- Choi, S. J., Oh, J. M. and Choy, J. H. (2009) 'Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells', *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(3), pp. 463–471. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2008.12.017.
- Clark, K. A. *et al.* (2012) 'Evaluation of the interactions between multiwalled carbon nanotubes and caco-2 cells', *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 75(1), pp. 25–35. doi: 10.1080/15287394.2011.589105.
- Cui, D. *et al.* (2005) 'Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells', *Toxicology Letters*, 155(1), pp. 73–85. doi: 10.1016/j.toxlet.2004.08.015.
- Cveticanin, J. *et al.* (2010) 'Using carbon nanotubes to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells', *Nanotechnology*, 21(1). doi: 10.1088/0957-4484/21/1/015102.
- Dave, P. N. and Chopda, L. V. (2014) 'Application of iron oxide nanomaterials for the removal of heavy metals', *Journal of Nanotechnology*. Hindawi Publishing Corporation. doi: 10.1155/2014/398569.
- Davoren, M. *et al.* (2007) 'In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells', *Toxicology in Vitro*, 21(3), pp. 438–448. doi: 10.1016/j.tiv.2006.10.007.
- De, S. and Madhuri, R. (2020) 'Functionalized nanomaterials for electronics and electrical and energy industries.', in *Handbook of Functionalized Nanomaterials for Industrial Applications*, pp. 269–296.
- Dhawan, A. *et al.* (2006) 'Stable colloidal dispersions of C60 fullerenes in water: Evidence for genotoxicity', *Environmental Science and Technology*, 40(23), pp. 7394–7401. doi: 10.1021/es0609708.
- Dhawan, A. and Sharma, V. (2010) 'Toxicity assessment of nanomaterials: Methods and challenges', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Anal Bioanal Chem, pp. 589–605. doi: 10.1007/s00216-010-3996-x.

- Díez-Pascual, A. M. (2018) 'Antibacterial activity of nanomaterials', *Nanomaterials*. MDPI AG, p. 359. doi: 10.3390/nano8060359.
- Ding, L. *et al.* (2005) 'Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast', *Nano Letters*, 5(12), pp. 2448–2464. doi: 10.1021/nl051748o.
- Divya, C. and Muthuvinothini, A. (2015) 'Nanoscience and Nanotechnology', *Nanoscience and Nanotechnology*, 2, pp. 1–3. doi: 10.5348/N02-2015-2-ED-1.
- Dolez, P. I. (2015) 'Nanomaterials Definitions, Classifications, and Applications', in *Nanoengineering: Global Approaches to Health and Safety Issues*. Elsevier, pp. 3–40. doi: 10.1016/B978-0-444-62747-6.00001-4.
- Doshi, N. and Mitragotri, S. (2010) 'Needle-shaped polymeric particles induce transient disruption of cell membranes', *Journal of the Royal Society Interface*, 7(SUPPL. 4). doi: 10.1098/rsif.2010.0134.focus.
- Duffin, R., Mills, N. L. and Donaldson, K. (2007) 'Nanoparticles - A thoracic toxicology perspective', *Yonsei Medical Journal*. Yonsei Med J, pp. 561–572. doi: 10.3349/ymj.2007.48.4.561.
- Duncan, R. and Izzo, L. (2005) 'Dendrimer biocompatibility and toxicity', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Adv Drug Deliv Rev, pp. 2215–2237. doi: 10.1016/j.addr.2005.09.019.
- Egusquiguirre, S. P. *et al.* (2012) 'Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: Advances in clinical and preclinical research', *Clinical and Translational Oncology*. Clin Transl Oncol, pp. 83–93. doi: 10.1007/s12094-012-0766-6.
- Elsaesser, A. and Howard, C. V. (2012) 'Toxicology of nanoparticles', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Adv Drug Deliv Rev, pp. 129–137. doi: 10.1016/j.addr.2011.09.001.
- Espitia, P. J. P. *et al.* (2012) 'Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications', *Food and Bioprocess Technology*. Springer Nature, pp. 1447–1464. doi: 10.1007/s11947-012-0797-6.
- Evans, S. J. *et al.* (2017) 'Critical review of the current and future challenges

- associated with advanced in vitro systems towards the study of nanoparticle (secondary) genotoxicity', *Mutagenesis*. Oxford University Press, pp. 233–241. doi: 10.1093/mutage/gew054.
- Farré, M. *et al.* (2009) 'Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(1), pp. 81–95. doi: 10.1007/s00216-008-2458-1.
- Finaud, J., Lac, G. and Filaire, E. (2006) 'Oxidative stress: Relationship with exercise and training', *Sports Medicine*. Sports Med, pp. 327–358. doi: 10.2165/00007256-200636040-00004.
- Fiorito, S. *et al.* (2006) 'Effects of fullerenes and single-wall carbon nanotubes on murine and human macrophages', *Carbon*, 44(6), pp. 1100–1105. doi: 10.1016/j.carbon.2005.11.009.
- Foldbjerg, R., Dang, D. A. and Autrup, H. (2011) 'Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549', *Archives of Toxicology*, 85(7), pp. 743–750. doi: 10.1007/s00204-010-0545-5.
- Freshney, R. I. (2011) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition*, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition*. John Wiley and Sons. doi: 10.1002/9780470649367.
- Fu, P. P. *et al.* (2014) 'Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species', *Journal of Food and Drug Analysis*. Elsevier Taiwan LLC, pp. 64–75. doi: 10.1016/j.jfda.2014.01.005.
- Fubini, B. and Hubbard, A. (2003) 'Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis', *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc., pp. 1507–1516. doi: 10.1016/S0891-5849(03)00149-7.
- Ganguly, P., Breen, A. and Pillai, S. C. (2018) 'Toxicity of Nanomaterials: Exposure, Pathways, Assessment, and Recent Advances', *ACS Biomaterials Science and Engineering*. American Chemical Society, pp. 2237–2275. doi: 10.1021/acsbiomaterials.8b00068.

- Gao, H., Shi, W. and Freund, L. B. (2005) 'Mechanics of receptor-mediated endocytosis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(27), pp. 9469–9474. doi: 10.1073/pnas.0503879102.
- Gökçay, B. and Arda, B. (2015) 'Nanotechnology, nanomedicine; Ethical aspects', *Revista Romana de Bioetica*, 13(3), pp. 1–12. Available at: /pmc/articles/PMC5393069/ (Accessed: 19 April 2021).
- Griffin, S. *et al.* (2018) 'Natural nanoparticles: A particular matter inspired by nature', *Antioxidants*. MDPI AG. doi: 10.3390/antiox7010003.
- Guan, R. *et al.* (2012) 'Cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity in human hepatocyte and embryonic kidney cells exposed to ZnO nanoparticles', *Nanoscale Research Letters*, 7(1), p. 602. doi: 10.1186/1556-276X-7-602.
- Guo, N. L. *et al.* (2012) 'Multiwalled carbon nanotube-induced gene signatures in the mouse lung: Potential predictive value for human lung cancer risk and prognosis', *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 75(18), pp. 1129–1153. doi: 10.1080/15287394.2012.699852.
- Gupta, A. K. and Wells, S. (2004) 'Surface-Modified Superparamagnetic Nanoparticles for Drug Delivery: Preparation, Characterization, and Cytotoxicity Studies', *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 3(1), pp. 66–73. doi: 10.1109/TNB.2003.820277.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd edn.
- Hansen, J. and Bross, P. (2010) 'A cellular viability assay to monitor drug toxicity', in *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp. 303–311. doi: 10.1007/978-1-60761-756-3_21.
- Henry, C. R. (2005) 'Morphology of supported nanoparticles', *Progress in Surface Science*, pp. 92–116. doi: 10.1016/j.progsurf.2005.09.004.
- Hsin, Y. H. *et al.* (2008) 'The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells', *Toxicology Letters*, 179(3), pp. 130–139. doi: 10.1016/j.toxlet.2008.04.015.

- Hu, A. P., Covic, G. A. and Boys, J. T. (2006) 'Direct ZVS start-up of a current-fed resonant inverter', *IEEE Transactions on Power Electronics*, 21(3), pp. 809–812. doi: 10.1021/bm050870e.
- Huang, C. C. *et al.* (2010) 'Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles', *Toxicology in Vitro*, 24(1), pp. 45–55. doi: 10.1016/j.tiv.2009.09.007.
- Huang, J. *et al.* (2015) 'Bio-inspired synthesis of metal nanomaterials and applications', *Chemical Society Reviews*, 44(17), pp. 6330–6374. doi: 10.1039/c5cs00133a.
- Hulla, J. E., Sahu, S. C. and Hayes, A. W. (2015) 'Nanotechnology: History and future', *Human and Experimental Toxicology*. SAGE Publications Ltd, pp. 1318–1321. doi: 10.1177/0960327115603588.
- Hussain, S. M. *et al.* (2005) 'In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells', in *Toxicology in Vitro*. Toxicol In Vitro, pp. 975–983. doi: 10.1016/j.tiv.2005.06.034.
- Jeevanandam, J. *et al.* (2018) 'Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations', *Beilstein Journal of Nanotechnology*. Beilstein-Institut Zur Forderung der Chemischen Wissenschaften, pp. 1050–1074. doi: 10.3762/bjnano.9.98.
- Jenkins, R. (1988) 'Free radical chemistry. Relationship to exercise ', *Sports Medicine*, 5(3), pp. 156–170.
- Ji, L. L. (1999) 'Antioxidants and oxidative stress in exercise', in *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Blackwell Publishing Inc., pp. 283–292. doi: 10.1046/j.1525-1373.1999.d01-145.x.
- Ji, Z. *et al.* (2009) 'The hepatotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in mice', *Nanotechnology*, 20(44), p. 445101. doi: 10.1088/0957-4484/20/44/445101.
- Jia, G. *et al.* (2005) 'Cytotoxicity of carbon nanomaterials: Single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene', *Environmental Science and Technology*, 39(5), pp. 1378–1383. doi: 10.1021/es048729l.

- Jones, C. F. and Grainger, D. W. (2009) 'In vitro assessments of nanomaterial toxicity', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Adv Drug Deliv Rev, pp. 438–456. doi: 10.1016/j.addr.2009.03.005.
- Kamyshny, A. and Magdassi, S. (2014) 'Conductive nanomaterials for printed electronics', *Small*. Wiley-VCH Verlag, pp. 3515–3535. doi: 10.1002/sml.201303000.
- Kang, S., Mauter, M. S. and Elimelech, M. (2008) 'Physicochemical determinants of multiwalled carbon nanotube bacterial cytotoxicity', *Environmental Science and Technology*, 42(19), pp. 7528–7534. doi: 10.1021/es8010173.
- Kaur, M. *et al.* (2015) 'Nanotechnology: A Review', in *Second National Conference on Advances in manufacturing Systems- CAMS-2015*. Available at: https://www.researchgate.net/publication/289871657_Nanotechnology_A_Review (Accessed: 30 May 2021).
- Kawata, K., Osawa, M. and Okabe, S. (2009) 'In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells', *Environmental Science and Technology*, 43(15), pp. 6046–6051. doi: 10.1021/es900754q.
- Kerfahi, D. *et al.* (2015) 'Effects of functionalized and raw multi-walled carbon nanotubes on soil bacterial community composition', *PLoS ONE*, 10(3), p. e0123042. doi: 10.1371/journal.pone.0123042.
- Kim, J. S. *et al.* (2010) 'Determination of cytotoxicity attributed to multiwall carbon nanotubes (MWCNT) in normal human embryonic lung cell (WI-38) line', *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 73(21–22), pp. 1521–1529. doi: 10.1080/15287394.2010.511577.
- Kim, S. C. *et al.* (2001) 'In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: Toxicity and efficacy', *Journal of Controlled Release*, 72(1–3), pp. 191–202. doi: 10.1016/S0168-3659(01)00275-9.
- Kim, Y.-J. *et al.* (2009) 'Genotoxicity of Aluminum Oxide (Al₂O₃) Nanoparticle in Mammalian Cell Lines | Request PDF', *Molecular and Cellular Toxicology*, 5(2), pp. 172–178.

- Kiss, B. *et al.* (2008) 'Investigation of micronized titanium dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions of human skin-derived cells', *Experimental Dermatology*, 17(8), pp. 659–667. doi: 10.1111/j.1600-0625.2007.00683.x.
- Knaapen, A. M. *et al.* (2004) 'Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms', *International Journal of Cancer*. Int J Cancer, pp. 799–809. doi: 10.1002/ijc.11708.
- Kolahalam, L. A. *et al.* (2019) 'Review on nanomaterials: Synthesis and applications', in *Materials Today: Proceedings*. Elsevier Ltd, pp. 2182–2190. doi: 10.1016/j.matpr.2019.07.371.
- Kumar, L. Y. (2015) 'Role and adverse effects of nanomaterials in food technology', *Journal of Toxicology and Health*, 2(1), p. 2. doi: 10.7243/2056-3779-2-2.
- Lam, C. W. *et al.* (2004) 'Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation', *Toxicological Sciences*, 77(1), pp. 126–134. doi: 10.1093/toxsci/kfg243.
- Lam, C. W. *et al.* (2006) 'A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks', *Critical Reviews in Toxicology*. Crit Rev Toxicol, pp. 189–217. doi: 10.1080/10408440600570233.
- Landsiedel, R. *et al.* (2014) 'Application of short-term inhalation studies to assess the inhalation toxicity of nanomaterials', *Particle and Fibre Toxicology*, 11(1). doi: 10.1186/1743-8977-11-16.
- Larese Filon, F. *et al.* (2015) 'Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. Academic Press Inc., pp. 310–322. doi: 10.1016/j.yrtph.2015.05.005.
- Laridi, R. *et al.* (2003) 'Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation ehab kheadr Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation', *International Dairy Journal*, 13, pp. 325–336. doi: 10.1016/S0958-6946(02)00194-2.
- Lasagna-Reeves, C. *et al.* (2010) 'Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles

- after repeated administration in mice', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(4), pp. 649–655. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.046.
- Lehr, C.-M. (ed.) (2002) *Cell Culture Models of Biological Barriers*. 1st Edition, *Cell Culture Models of Biological Barriers*. 1st Edition. London: CRC Press. doi: 10.1201/9780203219935.
- Lei, R. *et al.* (2008) 'Integrated metabolomic analysis of the nano-sized copper particle-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: A rapid in vivo screening method for nanotoxicity', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 232(2), pp. 292–301. doi: 10.1016/j.taap.2008.06.026.
- Lemaire, F. *et al.* (2007) 'Toxicity assays in nanodrops combining bioassay and morphometric endpoints', *PLoS ONE*, 2(1), p. 163. doi: 10.1371/journal.pone.0000163.
- Li, J. J. *et al.* (2010) 'Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles', *Biomaterials*, 31(23), pp. 5996–6003. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.04.014.
- Li, Y. P. *et al.* (2001) 'PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: Synthesis, preparation and biodistribution in rats', *Journal of Controlled Release*, 71(2), pp. 203–211. doi: 10.1016/S0168-3659(01)00218-8.
- Lin, J. *et al.* (2010) 'Penetration of lipid membranes by gold nanoparticles: Insights into cellular uptake, cytotoxicity, and their relationship', *ACS Nano*, 4(9), pp. 5421–5429. doi: 10.1021/nn1010792.
- Long, T. C. *et al.* (2007) 'Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro', *Environmental Health Perspectives*, 115(11), pp. 1631–1637. doi: 10.1289/ehp.10216.
- Madani, S. Y., Mandel, A. and Seifalian, A. M. (2013) 'A concise review of carbon nanotube's toxicology', *Nano Reviews*, 4(1), p. 21521. doi: 10.3402/nano.v4i0.21521.
- Mailänder, V. and Landfester, K. (2009) 'Interaction of nanoparticles with cells', *Biomacromolecules*. American Chemical Society, pp. 2379–2400. doi: 10.1021/bm900266r.

- Malm, C. (2001) 'Exercise-induced muscle damage and inflammation: Fact or fiction?', in *Acta Physiologica Scandinavica*. Acta Physiol Scand, pp. 233–239. doi: 10.1046/j.1365-201X.2001.00825.x.
- Manke, A., Wang, L. and Rojanasakul, Y. (2013) 'Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity', *BioMed Research International*. Biomed Res Int. doi: 10.1155/2013/942916.
- Maurer-Jones, M. A. *et al.* (2013) 'Toxicity of engineered nanoparticles in the environment', *Analytical Chemistry*, 85(6), pp. 3036–3049. doi: 10.1021/ac303636s.
- Di Meo, S. and Venditti, P. (2001) 'Mitochondria in Exercise-Induced Oxidative Stress', *Neurosignals*, 10(1–2), pp. 125–140. doi: 10.1159/000046880.
- Mitchell, L. A. *et al.* (2009) 'Mechanisms for how inhaled multiwalled carbon nanotubes suppress systemic immune function in mice', *Nature Nanotechnology*, 4(7), pp. 451–456. doi: 10.1038/nnano.2009.151.
- Miura, N. and Shinohara, Y. (2009) 'Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(3), pp. 733–737. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.10.039.
- Mobasser, S. and Akbar Firoozi, A. (2016) 'Review of Nanotechnology Applications in Science and Engineering', *Journal of Civil Engineering and Urbanism*, 6(4), pp. 84–93.
- Mohan Bhagyaraj, S. and Oluwafemi, O. S. (2018) 'Nanotechnology: The Science of the Invisible', in *Synthesis of Inorganic Nanomaterials*. Elsevier, pp. 1–18. doi: 10.1016/b978-0-08-101975-7.00001-4.
- Monteiro-Riviere, N. A. *et al.* (2005) 'Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes', *Toxicology Letters*, 155(3), pp. 377–384. doi: 10.1016/j.toxlet.2004.11.004.
- Monteiro-Riviere, N. A. and Riviere, J. E. (2009) 'Interaction of nanomaterials with skin: Aspects of absorption and biodistribution', in *Nanotoxicology*, pp. 188–193. doi: 10.1080/17435390902906803.
- Muller, J. *et al.* (2005) 'Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes',

Toxicology and Applied Pharmacology, 207(3), pp. 221–231. doi: 10.1016/j.taap.2005.01.008.

Naqvi, S. *et al.* (2010) ‘Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress’, *International Journal of Nanomedicine*, 5(1), pp. 983–989. doi: 10.2147/IJN.S13244.

Nel, A. *et al.* (2006) ‘Toxic potential of materials at the nanolevel’, *Science*. Science, pp. 622–627. doi: 10.1126/science.1114397.

Nikalje, A. P. (2015) ‘Nanotechnology and its Applications in Medicine’, *Medicinal Chemistry*, 5(2). doi: 10.4172/2161-0444.1000247.

Nikolaidis, M. G. *et al.* (2008) ‘The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: Magnitude and time-course considerations’, *Sports Medicine*. Sports Med, pp. 579–606. doi: 10.2165/00007256-200838070-00005.

Nygaard, U. C. *et al.* (2009) ‘Single-walled and multi-walled carbon nanotubes promote allergic immune responses in mice’, *Toxicological Sciences*, 109(1), pp. 113–123. doi: 10.1093/toxsci/kfp057.

Oberdörster, G. *et al.* (2002) ‘Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats’, *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*, 65(20), pp. 1531–1543. doi: 10.1080/00984100290071658.

Oberdörster, G. *et al.* (2004) ‘Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain’, in *Inhalation Toxicology*. Inhal Toxicol, pp. 437–445. doi: 10.1080/08958370490439597.

Oberdörster, G., Oberdörster, E. and Oberdörster, J. (2005) ‘Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles’, *Environmental Health Perspectives*. National Institute of Environmental Health Sciences, pp. 823–839. doi: 10.1289/ehp.7339.

Ore, S. (1956) ‘Oxidative Stress Relaxation of Natural Rubber Vulcanized with Di-Tertiary-Butyl Peroxide’, *Rubber Chemistry and Technology*, 29(3), pp. 1043–1046. doi: 10.5254/1.3542575.

- Osaki, F. *et al.* (2004) 'A quantum dot conjugated sugar ball and its cellular uptake. On the size effects of endocytosis in the subviral region', *Journal of the American Chemical Society*, 126(21), pp. 6520–6521. doi: 10.1021/ja048792a.
- Osman, I. F. *et al.* (2010) 'Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in HEp-2 cells', *Nanomedicine*, 5(8), pp. 1193–1203. doi: 10.2217/nmm.10.52.
- Palazzolo-Ballance, A. M., Suquet, C. and Hurst, J. K. (2007) 'Pathways for intracellular generation of oxidants and tyrosine nitration by a macrophage cell line', *Biochemistry*, 46(25), pp. 7536–7548. doi: 10.1021/bi700123s.
- Pan, Y. *et al.* (2009) 'Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage', *Small*, 5(18), pp. 2067–2076. doi: 10.1002/sml.200900466.
- Pan, Z. *et al.* (2009) 'Adverse effects of titanium dioxide nanoparticles on human dermal fibroblasts and how to protect cells', *Small*, 5(4), pp. 511–520. doi: 10.1002/sml.200800798.
- Park, Y. H. *et al.* (2010) 'Assessment of dermal toxicity of nanosilica using cultured keratinocytes, a human skin equivalent model and an in vivo model', *Toxicology*, 267(1–3), pp. 178–181. doi: 10.1016/j.tox.2009.10.011.
- Pasquini, L. M. *et al.* (2012) 'Impact of surface functionalization on bacterial cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes', *Environmental Science and Technology*, 46(11), pp. 6297–6305. doi: 10.1021/es300514s.
- Patlolla, A., Patlolla, B. and Tchounwou, P. (2010) 'Evaluation of cell viability, DNA damage, and cell death in normal human dermal fibroblast cells induced by functionalized multiwalled carbon nanotube', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 338(1–2), pp. 225–232. doi: 10.1007/s11010-009-0356-2.
- Paul, W. and Sharma, C. P. (2010) 'Inorganic nanoparticles for targeted drug delivery', in *Biointegration of Medical Implant Materials: Science and Design*. Elsevier Ltd., pp. 204–235. doi: 10.1533/9781845699802.2.204.
- Peralta-Videa, J. R. *et al.* (2011) 'Nanomaterials and the environment: A review for

the biennium 2008-2010', *Journal of Hazardous Materials*. J Hazard Mater, pp. 1–15. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.11.020.

Pernodet, N. *et al.* (2006) 'Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts', *Small*, 2(6), pp. 766–773. doi: 10.1002/smll.200500492.

Poole, C. and Owens, F. (2003) *Introduction to Nanotechnology* .

Popielarski, S. R. *et al.* (2005) 'A nanoparticle-based model delivery system to guide the rational design of gene delivery to the liver. 2. In vitro and in vivo uptake results', *Bioconjugate Chemistry*, 16(5), pp. 1071–1080. doi: 10.1021/bc0501146.

Prahalad, A. K. *et al.* (1999) 'Ambient air particles: Effects on cellular oxidant radical generation in relation to particulate elemental chemistry', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 158(2), pp. 81–91. doi: 10.1006/taap.1999.8701.

Pulskamp, K., Diabaté, S. and Krug, H. F. (2007) 'Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants', *Toxicology Letters*, 168(1), pp. 58–74. doi: 10.1016/j.toxlet.2006.11.001.

Puri, A. *et al.* (2009) 'Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: From concepts to clinic', *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. Begell House Inc., pp. 523–580. doi: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v26.i6.10.

Rahman, M. F. *et al.* (2009) 'Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles', *Toxicology Letters*, 187(1), pp. 15–21. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.01.020.

Ranjan, S. *et al.* (2014) 'Nanoscience and nanotechnologies in food industries: Opportunities and research trends', *Journal of Nanoparticle Research*. Kluwer Academic Publishers, p. 2464. doi: 10.1007/s11051-014-2464-5.

Ravichandran, P. *et al.* (2009) 'Induction of apoptosis in rat lung epithelial cells by multiwalled carbon nanotubes', *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 23(5), pp. 333–344. doi: 10.1002/jbt.20296.

Reddy, A. R. N. *et al.* (2010) 'Multi wall carbon nanotubes induce oxidative stress and cytotoxicity in human embryonic kidney (HEK293) cells', *Toxicology*, 272(1–3),

pp. 11–16. doi: 10.1016/j.tox.2010.03.017.

Reijnders, L. (2008) ‘Hazard reduction for the application of titania nanoparticles in environmental technology’, *Journal of Hazardous Materials*, 152(1), pp. 440–445. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.12.047.

Reza Mozafari, M. (2007) *Nanomaterials and nanosystems for biomedical applications, Nanomaterials and Nanosystems for Biomedical Applications*. Springer Netherlands. doi: 10.1007/978-1-4020-6289-6.

Ringwood, A. H. *et al.* (2010) ‘The effects of silver nanoparticles on oyster embryos’, *Marine Environmental Research*, 69(SUPPL. 1). doi: 10.1016/j.marenvres.2009.10.011.

Del Río, L. A. (2015) ‘ROS and RNS in plant physiology: An overview’, *Journal of Experimental Botany*. Oxford University Press, pp. 2827–2837. doi: 10.1093/jxb/erv099.

Roco, M. C. (2011) ‘The long view of nanotechnology development: The National Nanotechnology Initiative at 10 years’, *Journal of Nanoparticle Research*, pp. 427–445. doi: 10.1007/s11051-010-0192-z.

Roehm, N. W. *et al.* (1991) ‘An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT’, *Journal of Immunological Methods*, 142(2), pp. 257–265. doi: 10.1016/0022-1759(91)90114-U.

Roh, J. Y. *et al.* (2009) ‘Ecotoxicity of silver nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using functional ecotoxicogenomics’, *Environmental Science and Technology*, 43(10), pp. 3933–3940. doi: 10.1021/es803477u.

Saifi, M. A., Khan, W. and Godugu, C. (2018) ‘Cytotoxicity of Nanomaterials: Using Nanotoxicology to Address the Safety Concerns of Nanoparticles’, *Pharmaceutical Nanotechnology*, 6(1), pp. 3–16. doi: 10.2174/2211738505666171023152928.

Saleh, T. A. (2020) ‘Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities’, *Environmental Technology and Innovation*. Elsevier B.V., p. 101067. doi: 10.1016/j.eti.2020.101067.

Sathyanarayana, S. and Hübner, C. (2013) ‘Thermoplastic Nanocomposites with

Carbon Nanotubes', in, pp. 19–60. doi: 10.1007/978-3-642-40322-4_2.

Sayes, C. M., Reed, K. L. and Warheit, D. B. (2007) 'Assessing toxicology of fine and nanoparticles: Comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles', *Toxicological Sciences*, 97(1), pp. 163–180. doi: 10.1093/toxsci/kfm018.

Schins, R. P. F. *et al.* (2002) 'Surface modification of quartz inhibits toxicity, particle uptake, and oxidative DNA damage in human lung epithelial cells', *Chemical Research in Toxicology*, 15(9), pp. 1166–1173. doi: 10.1021/tx025558u.

Sen, C. K. (2001) 'Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: Introduction', in *Medicine and Science in Sports and Exercise*. American College of Sports Medicine, pp. 368–370. doi: 10.1097/00005768-200103000-00005.

Sen, C. K. and Packer, L. (1996) 'Antioxidant and redox regulation of gene transcription', *The FASEB Journal*, 10(7), pp. 709–720. doi: 10.1096/fasebj.10.7.8635688.

Sharifi, S. *et al.* (2012) 'Toxicity of nanomaterials', *Chemical Society Reviews*, 41(6), pp. 2323–2343. doi: 10.1039/c1cs15188f.

Shukla, R. *et al.* (2005) 'Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview', *Langmuir*. Langmuir, pp. 10644–10654. doi: 10.1021/la0513712.

Shvedova, A. *et al.* (2003) 'Exposure to carbon nanotube material: Assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells', *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*, 66(20), pp. 1909–1926. doi: 10.1080/713853956.

Shvedova, A. A. *et al.* (2005) 'Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice', *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 289(5 33-5). doi: 10.1152/ajplung.00084.2005.

Sies, H., Berndt, C. and Jones, D. P. (2017) 'Oxidative Stress', *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), pp. 715–748. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037.

Sies, H. and Cadenas, E. (1985) 'Oxidative stress: damage to intact cells and organs.', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological*

- sciences*, 311(1152), pp. 617–631. doi: 10.1098/rstb.1985.0168.
- Sies, H. and Jones, D. (2007) ‘Oxidative Stress’, in Fink, G. (ed.) *Encyclopedia of Stress*. 2nd edition, pp. 45–48.
- Singh, A. V. *et al.* (2011) ‘Rapid prototyping of nano- and micro-patterned substrates for the control of cell neuritogenesis by topographic and chemical cues’, *Materials Science and Engineering C*, 31(5), pp. 892–899. doi: 10.1016/j.msec.2011.02.006.
- Singh, A. V. *et al.* (2019) ‘Review of emerging concepts in nanotoxicology: opportunities and challenges for safer nanomaterial design’, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 29(5), pp. 378–387. doi: 10.1080/15376516.2019.1566425.
- Singh, S. and Nalwa, H. S. (2007) ‘Nanotechnology and health safety - Toxicity and risk assessments of nanostructured materials on human health’, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. J Nanosci Nanotechnol, pp. 3048–3070. doi: 10.1166/jnn.2007.922.
- Storz, G. and Imlay, J. A. (1999) ‘Oxidative stress’, *Current Opinion in Microbiology*, 2(2), pp. 188–194. doi: 10.1016/S1369-5274(99)80033-2.
- Sudha, P. N. *et al.* (2018) ‘Nanomaterials history, classification, unique properties, production and market’, in *Emerging Applications of Nanoparticles and Architectural Nanostructures: Current Prospects and Future Trends*. Elsevier Inc., pp. 341–384. doi: 10.1016/B978-0-323-51254-1.00012-9.
- Szentkuti, L. (1997) ‘Light microscopical observations on luminally administered dyes, dextrans, nanospheres and microspheres in the pre-epithelial mucus gel layer of the rat distal colon’, *Journal of Controlled Release*, 46(3), pp. 233–242.
- Takeuchi, T., Nakajima, M. and Morimoto, K. (1999) ‘A human cell system for detecting asbestos cytogenotoxicity in vitro’, *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 438(1), pp. 63–70. doi: 10.1016/S1383-5718(98)00163-6.
- Tang, J. *et al.* (2009) ‘Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats’, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9(8), pp. 4924–4932. doi: 10.1166/jnn.2009.1269.

- Tarafdar, J., Shikha, S. and Ramesh, R. (2013) 'Nanotechnology: Interdisciplinary science of applications', *African Journal of Biotechnology*, 12(3), pp. 219–226. doi: 10.5897/ajb12.2481.
- Teow, Y. *et al.* (2011) 'Health impact and safety of engineered nanomaterials', *Chemical Communications*, 47(25), pp. 7025–7038. doi: 10.1039/c0cc05271j.
- Thannickal, V. J. and Fanburg, B. L. (2000) 'Reactive oxygen species in cell signaling', *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. American Physiological Society. doi: 10.1152/ajplung.2000.279.6.11005.
- Tkachenko, A. G. *et al.* (2004) 'Cellular trajectories of peptide-modified gold particle complexes: Comparison of nuclear localization signals and peptide transduction domains', *Bioconjugate Chemistry*, 15(3), pp. 482–490. doi: 10.1021/bc034189q.
- Torchilin, V. (2008) 'Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers: Development of the Concept', in, pp. 1–32. doi: 10.1007/978-0-387-76554-9_1.
- Tsatsakis, A. M. *et al.* (2017) 'Simulating real-life exposures to uncover possible risks to human health: A proposed consensus for a novel methodological approach', *Human and Experimental Toxicology*, 36(6), pp. 554–564. doi: 10.1177/0960327116681652.
- Tsatsakis, A. M., Docea, A. O. and Tsitsimpikou, C. (2016) 'New challenges in risk assessment of chemicals when simulating real exposure scenarios; simultaneous multi-chemicals' low dose exposure', *Food and Chemical Toxicology*, 96, pp. 174–176. doi: 10.1016/j.fct.2016.08.011.
- Tsiaoussis, J. *et al.* (2019) 'Effects of single and combined toxic exposures on the gut microbiome: Current knowledge and future directions', *Toxicology Letters*, 312, pp. 72–97. doi: 10.1016/j.toxlet.2019.04.014.
- Tsukatani, T. *et al.* (2009) 'Colorimetric microbial viability assay based on reduction of water-soluble tetrazolium salts for antimicrobial susceptibility testing and screening of antimicrobial substances', *Analytical Biochemistry*, 393(1), pp. 117–125. doi: 10.1016/j.ab.2009.06.026.
- Valcárcel, M. and López-Lorente, A. I. (2014) 'Gold Nanoparticles in Analytical

Chemistry ', in.

Vallyathan, V. and Shi, X. (1997) 'The role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung diseases', *Environmental Health Perspectives*. Public Health Services, US Dept of Health and Human Services, pp. 165–177. doi: 10.1289/ehp.97105s1165.

Vardakas, P. *et al.* (2021) 'An integrated approach for assessing the in vitro and in vivo redox-related effects of nanomaterials', *Environmental Research*, 197, p. 111083. doi: 10.1016/j.envres.2021.111083.

Verma, A. and Stellacci, F. (2010) 'Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions', *Small*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 12–21. doi: 10.1002/smll.200901158.

VinÑa, J. *et al.* (2001) 'Free Radicals in Exhaustive Physical Exercise: Mechanism of Production, and Protection by Antioxidants', *IUBMB Life*, 50(4), pp. 271–277. doi: 10.1080/713803729.

Walker, V. G. *et al.* (2009) 'Potential in vitro effects of carbon nanotubes on human aortic endothelial cells', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236(3), pp. 319–328. doi: 10.1016/j.taap.2009.02.018.

Wang, H. *et al.* (2010) 'An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells', *Journal of Microbiological Methods*, 82(3), pp. 330–333. doi: 10.1016/j.mimet.2010.06.014.

Wang, L., Zhao, W. and Tan, W. (2008) 'Bioconjugated silica nanoparticles: Development and applications', *Nano Research*, 1(2), pp. 99–115. doi: 10.1007/s12274-008-8018-3.

Wataha, J. C., Hanks, C. T. and Craig, R. G. (1991) 'The in vitro effects of metal cations on eukaryotic cell metabolism', *Journal of Biomedical Materials Research*, 25(9), pp. 1133–1149. doi: 10.1002/jbm.820250907.

Wills, J. W. *et al.* (2016) 'Genetic toxicity assessment of engineered nanoparticles using a 3D in vitro skin model (EpiDermTM)', *Particle and Fibre Toxicology*, 13(1),

pp. 1–21. doi: 10.1186/s12989-016-0161-5.

Wilson, M. R. *et al.* (2002) ‘Interactions between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro’, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 184(3), pp. 172–179. doi: 10.1006/taap.2002.9501.

Wise, J. P. *et al.* (2010) ‘Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells’, *Aquatic Toxicology*, 97(1), pp. 34–41. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.11.016.

Wiwanitkit, V., Sereemasapun, A. and Rojanathanes, R. (2009) ‘Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: the first world report’, *Fertility and Sterility*, 91(1), p. e7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.08.021.

Xu, Z. P. *et al.* (2006) ‘Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery’, *Chemical Engineering Science*, 61(3), pp. 1027–1040. doi: 10.1016/j.ces.2005.06.019.

Yehia, H. N. *et al.* (2007) ‘Single-walled carbon nanotube interactions with HeLa cells’, *Journal of Nanobiotechnology*, 5(1), pp. 1–17. doi: 10.1186/1477-3155-5-8.

Yoo, J. W., Doshi, N. and Mitragotri, S. (2011) ‘Adaptive micro and nanoparticles: Temporal control over carrier properties to facilitate drug delivery’, *Advanced Drug Delivery Reviews*. *Adv Drug Deliv Rev*, pp. 1247–1256. doi: 10.1016/j.addr.2011.05.004.

Yu, W. W. *et al.* (2006) ‘Aqueous dispersion of monodisperse magnetic iron oxide nanocrystals through phase transfer’, *Nanotechnology*, 17(17), pp. 4483–4487. doi: 10.1088/0957-4484/17/17/033.

Zeng, L. *et al.* (2019) ‘Growth model interpretation of planet size distribution’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(20), pp. 9723–9728. doi: 10.1073/pnas.1812905116.

Zhang, L. W. *et al.* (2009) ‘Endocytic mechanisms and toxicity of a functionalized fullerene in human cells’, *Toxicology Letters*, 191(2–3), pp. 149–157. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.08.017.

Zhang, X. F. *et al.* (2016) ‘Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches’, *International Journal of*

Molecular Sciences. MDPI AG. doi: 10.3390/ijms17091534.

Zhu, M. T. *et al.* (2008) ‘Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats’, *Toxicology*, 247(2–3), pp. 102–111. doi: 10.1016/j.tox.2008.02.011.

Zhu, X. *et al.* (2004) ‘Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses’, *Biomaterials*, 25(18), pp. 4087–4103. doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.11.011.